

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003 年 10 月 23 日 (23.10.2003)

PCT

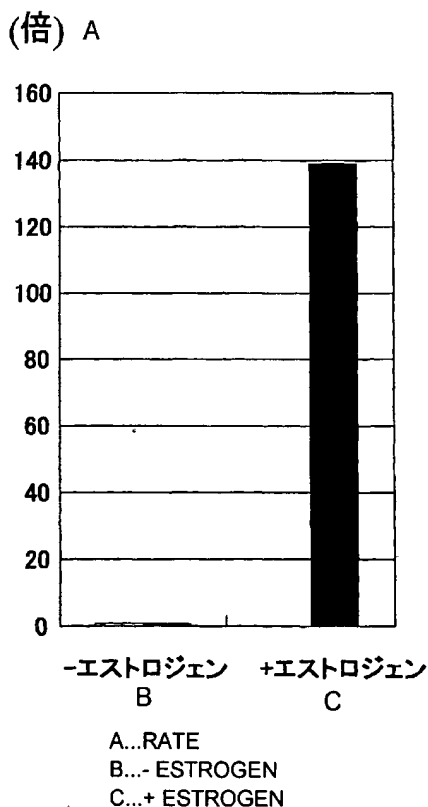
(10) 国際公開番号
WO 03/087366 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/09, 5/10, LTD.) [JP/JP]; 〒100-8185 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 Tokyo (JP).
C07K 14/705, C12Q 1/02 // C12R 1:91
- (21) 国際出願番号: PCT/JP03/04840 (72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 佐々木 克敏 (SASAKI, Katsutoshi) [JP/JP]; 〒194-8533 東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醸酵工業株式会社 東京研究所内 Tokyo (JP). 三浦 和美 (MIURA, Kazumi) [JP/JP]; 〒194-8533 東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醸酵工業株式会社 東京研究所内 Tokyo (JP). 佐伯 智 (SAEKI, Satoshi) [JP/JP]; 〒194-8533 東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醸酵工業株式会社 東京研究所内 Tokyo (JP). 吉澤 美佐子 (YOSHIZAWA, Misako) [JP/JP]; 〒194-8533 東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醸酵工業株式会社 東京研究所内 Tokyo (JP). 岸本 和也 (KISHIMOTO, Kazuya) [JP/JP]; 〒411-8731 静岡県駿東郡長泉町下土狩1188 協和醸酵工
- (22) 国際出願日: 2003 年 4 月 16 日 (16.04.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願2002-113030 2002 年 4 月 16 日 (16.04.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 協和醸酵工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO.,

[続葉有]

(54) Title: ENDOCRINE CELL LINES AND METHOD OF USING THE SAME

(54) 発明の名称: 内分泌系細胞株とその利用法



(57) Abstract: It is intended to provide: (1) various cell lines originating in mammalian hypothalamus and pancreatic islet; (2) an expression cloning system of an active peptide precursor gene using such a cell line as a host and a process for producing an active peptide; (3) a method of searching for a substance acting on the cells and a method of evaluating the same with the use of the above cell line; (4) a method of searching for a useful gene or a useful peptide and a method of acquiring the same with the use of the above cell line; and (5) a highly sensitive and convenient GPCR ligand assay system to be used in the above expression cloning system.

(57) 要約: 本発明により、(1)哺乳動物の視床下部およびランゲルハンス氏島由来の多様な細胞株、(2)該細胞株を宿主として用いた、活性ペプチド前駆体遺伝子の発現クローニング系および活性ペプチドの生産法、(3)該細胞株を用いた、該細胞に作用する物質の探索法や評価法、(4)該細胞株を用いた有用遺伝子または有用ペプチドの探索法および取得法、(5)上記の発現クローニング系で使用する高感度で簡便なGPCRリガンドのアッセイ系が提供される。

WO 03/087366 A1



業株式会社 医薬総合研究所内 Shizuoka (JP). 國友
博文 (KUNITOMO,Hirofumi) [JP/JP]; 〒181-0015 東
京都 三鷹市 大沢二丁目 2 0-3 2 Tokyo (JP). 西達
也 (NISHI,Tatsunari) [JP/JP]; 〒145-0074 東京都 大
田区 東横町 3 9-1 5 Tokyo (JP). 帯刀 益夫 (OBI-
NATA,Masuo) [JP/JP]; 〒980-0871 宮城県 仙台市 青葉
区 八幡 5-3-1 0-4 0 2 Miyagi (JP).

- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO,
NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU,
ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

内分泌系細胞株とその利用法

技術分野

本発明は、受容体のアゴニスト、アンタゴニストまたはインバースアゴニストとして作用するペプチドをコードするDNAの取得方法、該ペプチドの検出または取得方法、これらの方法に用いる内分泌細胞由来の細胞株、該内分泌細胞由来の細胞株を用いたペプチドの製造方法、上記の方法に用いる受容体を発現させるB細胞株、該B細胞株を用いた被検物質に反応するペプチドをコードするDNAの取得方法、該B細胞株を用いたペプチドをコードするDNAの取得方法、該取得方法により得られる構成活性型変異G蛋白質共役型受容体、該B細胞株を用いたG蛋白質共役型受容体のアゴニスト、アンタゴニスト、インバースアゴニストの取得方法、該B細胞株を用いたペプチドの活性化剤または阻害剤の取得法。該B細胞株を宿主として用いる宿主・ベクター系に関する。

背景技術

一般に、ペプチド性のホルモンや神経伝達物質は、前駆体（プレプロ体）として生産された後、複数のプロセシング酵素や修飾酵素が作用することにより、最終的に活性型のペプチドとなることが知られている〔Curr. Opin. Chem. Biol., 2, 31 (1998)〕。

特定のプロセシング酵素や修飾酵素は、特定の内分泌細胞にしか発現していないため、例えば視床下部、脳下垂体、あるいは膵臓のランゲルハンス氏島の神経細胞や内分泌細胞で生産される活性ペプチド（例えばバソプレッシンやグルカゴン）の前駆体遺伝子を、遺伝子発現によく使用されるCOS細胞やCHO細胞などの非内分泌系の細胞で発現させても、一般に活性型のペプチドは生産されない。

内分泌細胞のように、もともと特定の活性ペプチドを生産する能力のある細胞は、該活性ペプチドのプロセシング酵素や修飾酵素を発現しているため、該細胞を宿主として該ペプチドの前駆体遺伝子を発現させれば、該ペプチドを活性のある形で発現することが可能と考えられる。また、該細胞で発現しているプロセシ

ング酵素や修飾酵素によって正常のプロセッシングや修飾を受けることのできる他の活性ペプチドに関しても、該細胞を宿主としてその前駆体遺伝子を発現させることにより、活性のあるペプチドを発現することができると考えられる。

内分泌細胞より樹立した株化細胞（以下、内分泌細胞株と呼ぶ）に既知の活性ペプチド前駆体遺伝子を導入して発現させ、活性ペプチドを生産させる方法として、放射線照射により誘発したラットのランゲルハンス氏島の癌細胞より樹立されたRIN細胞に、プレプロインスリン遺伝子またはプレプロアミリン遺伝子を導入して発現させ、インスリンやアミリンを生産させる方法（US6194176、US6110707）、トランスジェニックマウスに生じた腫瘍β細胞から樹立されたMIN6細胞株に、プレプロインスリン遺伝子を導入して発現させ、Cペプチドを生産する方法〔Nat. Cell Biol., 2, 805 (2000)〕等が知られている。

上記のように、内分泌細胞株を用いた既知の活性ペプチドの生産方法は幾つか知られているが、該分泌細胞株が新規の活性ペプチドを探索するために有用であることを記載あるいは示唆する文献はない。

また、新たな活性を有するペプチドや該ペプチドをコードする遺伝子を効率良く見出すためには、遺伝子発現用の宿主として使用する内分泌細胞株、遺伝子ソースとして使用する内分泌細胞株、およびペプチドの活性を検出するためのアクセシ系などに関してさらなる改善が求められている。

内分泌細胞株としては、これまでに下記のような（1）視床下部由来あるいは（2）ランゲルハンス氏島由来の細胞株が知られている。

（1）視床下部由来の細胞株

視床下部由来の細胞株として、下記（i）～（v）の細胞株が知られている。

（i）マウス胎児（胎生14日目）の視床下部由来の初代培養細胞をSV40に感染させることにより取得された不死化細胞

上記不死化細胞として、HT9、該HT9細胞由来のシングルクローン細胞（HT9-C7）等が知られている。HT9-C7はニューロフィジンおよびバソプレッシンを発現する〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71, 3575 (1974)〕。

（ii）ラット胎児（胎生16日目）の視床下部由来の初代培養細胞をSV40に感染させることにより取得された不死化細胞株

上記不死化細胞として、RCF-8、RCA-6、RCF-27、RCD-15、D12等が知られている。

これらの細胞株はエストロゲン受容体を発現する〔*Endocrinology*, 126, 235 (1990); *Endocrinology*, 140, 23928 (1999)〕。

(iii) ラット胎児（胎生15日および16日目）の視交叉上核由来の初代培養細胞を、アデノウイルス2とアデノウイルス5のハイブリッドE1A 12Sを発現可能なレトロウイルスに感染させることにより取得された、2種の視交叉上核由来の不活化細胞株

上記不活化細胞として、SCN1.4、SCN2.2等が知られている〔*J. Neurobiol.*, 39, 1 (1999)〕。SCN1.4およびSCN2.2の細胞株の大部分はグリア細胞様の形態を示すが、グリア細胞特異的抗原の発現は限られている。また、一部の細胞は神経細胞に特徴的な性質を示し、神経細胞特異的抗原や視交叉上核の神経細胞で発現している神経ペプチドであるソマトスタチン、vasoactive intestinal polypeptide (VIP)、gastrin-releasing peptide (GRP)、またはアルギニンバソプレッシン (AVP) を発現し、視交叉上核の神経細胞では発現のみられないオキシトシンやコルチコトロピン放出ホルモン (CRH) は発現しない。細胞の分化を促す条件下で培養すると、上記で発現のみられた神経ペプチドを発現する細胞の数が増加する。

(iv) 視床下部で発現するゴナドトロピン放出ホルモン (GnRH) 遺伝子のプロモーターを用いてSV40ラージT抗原を発現させたトランスジェニックマウスの後脳にできた腫瘍から樹立された細胞株

上記細胞株として、GT1、GT1-1、GT1-3、GT1-7等が知られている〔*Neuron*, 5, 1 (1990)〕。GT1-1およびGT1-7細胞はGnRH産生能を保持しており、GnRHの発現調節機構の解析に使用されている〔*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 1852 (1992); *Endocrinology*, 140, 1423 (1999)〕。

(v) 視床下部で発現するGnRH遺伝子のプロモーターを用いてSV40ラージT抗原を発現させたトランスジェニックマウスの嗅球にできた腫瘍から樹立された細胞株

上記細胞株として、GN等が知られている。GN細胞はGnRHを発現している〔*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 3402 (1991)〕。

内在性のレプチン受容体を発現する視床下部由来の細胞株が取得できれば、個々の神経細胞に対するレプチンの生物学的機能を解析することが可能になるが、上記視床下部由来の細胞株はいずれも、レプチン受容体を発現しておらず、これまでに内在性のレプチン受容体を発現する視床下部由来の細胞株は知られていない〔*Diabetes*, 49, 1443 (2000)、*Neuron*, 5, 1 (1990)〕。

レプチンは抗肥満薬や抗糖尿病薬として開発が進んでいるが、レプチン抵抗性の問題から、レプチンに変わる薬物の開発が求められている。レプチンの作用メカニズムの解明は、新たな生理活性物質の発見や創薬ターゲットの同定につながると考えられる。内在性のレプチン受容体を発現する視床下部由来の細胞株が取得できれば、該細胞株を用いて上記薬物のスクリーニングや評価を行うことも可能となる。

レプチン受容体遺伝子だけでなく、プレプロニューロメディンU遺伝子、RFamide-related peptide (RFRP) プレプロ蛋白質遺伝子、プレプロオレキシン遺伝子、プレプロオピオメラノコルチン遺伝子、プレプロニューロペプチドY遺伝子、プレプロニューロペプチドFF遺伝子、プレプロコルチコトロピン放出ホルモン遺伝子、プレプロサイロトロピン放出ホルモン遺伝子、プレプログレリン遺伝子、プレプロメラニン凝集ホルモン遺伝子、cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) 遺伝子、2型ニューロメディンU受容体 (NMU2R) 遺伝子、RFRP受容体遺伝子、4型メラノコルチン受容体 (MC4R) 遺伝子、1型ニューロペプチドY受容体 (NPY1R) 遺伝子、5型ニューロペプチドY受容体 (NPY5R) 遺伝子、2型ニューロペプチドFF受容体 (NPFF2) 遺伝子、1型コルチコトロピン放出ホルモン受容体 (CRHR-1) 遺伝子、2型コルチコトロピン放出ホルモン受容体 (CRHR-2) 遺伝子、グレリン受容体遺伝子、1型メラニン凝集ホルモン受容体 (MCHR1) 遺伝子、スルホニルウレア受容体遺伝子またはプレプロアグーチ関連ペプチド遺伝子、あるいはこれら遺伝子にコードされたポリペプチドを発現する視床下部由来の細胞株も知られていない。

視床下部は生命を維持するために最も重要な統制的機能を有しており、薬物のターゲット部位としても注目されている。したがって、機能を保持した視床下部由来の細胞株が取得できれば、個々の視床下部神経細胞の機能を、細胞レベルおよび分子レベルで研究することが可能になる。また、視床下部神経細胞をターゲットとした薬物の開発にも極めて有用である。視床下部に存在する内分泌性細胞は様々な活性ペプチドを生産していることが知られているため、多様な視床下部由来細胞株は、新たな活性ペプチドを探索する上でも非常に有用なソースとなると考えられる。

(2) ランゲルハンス氏島由来の細胞株

これまで、ランゲルハンス氏島由来の細胞株として、下記 (i) ~ (vii) の細胞株が知られている。

(i) 放射線で誘発したランゲルハンス氏島由来の癌から樹立された細胞株

上記樹立株として、RIN-m細胞（ラット細胞）、INS-1細胞（ラット細胞）、RIN-m細胞由来のシングルクローン細胞（RIN-5F、RIN-14B、RIN-m5F）等が知られている〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 628 (1977); Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 175, 35 (1984); Endocrinology, 130, 167 (1992)〕。放射線による癌の誘発頻度は低いため、ランゲルハンス氏島に存在する特定の細胞（ β 細胞等）しか癌化しないと考えられる。従って、上記樹立株は特定の細胞の癌化細胞由来と考えられる。

(ii) ハムスターのインスリノーマから樹立された細胞株

上記樹立株として、In-R1-G1、In-R1-G3、In-R1-G7、In-R1-G9、In-R1-G10、In-R1-G11等が知られている〔In Vitro Cell. Dev. Biol., 22, 120 (1986)〕。これら樹立株も、ランゲルハンス氏島に存在する特定の細胞の癌化細胞株と考えられている。

(iii) ランゲルハンス氏島の初代培養細胞をSV40でトランスフォームすることによって樹立された細胞株

上記樹立株として、ハムスター由来のHIT細胞等が知られている〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 4339 (1981); Biochem. J., 219, 547 (1984)〕。SV40による形質転換頻度は低く、また細胞の種類により該頻度が異なることより、これら樹立株も、ランゲルハンス氏島に存在する特定の細胞（ β 細胞等）の癌化細胞株と考えられている。

(iv) インスリンプロモーターのコントロール下にSV40ラージT抗原を発現するトランスジェニックマウスに生じた β 細胞由来と考えられる腫瘍から樹立された細胞株

上記樹立株として、 β TC細胞、NIT-1細胞、MIN6細胞等が知られている〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 9037 (1988); Diabetes, 40, 842 (1991); Endocrinology, 127, 126 (1990)〕。ここでSV40ラージT抗原は、ランゲルハンス氏島に存在する特定の細胞（ β 細胞等）でのみ発現するため、特定の細胞のみが不死化されていると考えられる。従って、これら樹立株も、ランゲルハンス氏島

に存在する特定の細胞の癌化細胞株と考えられている。

(v) インスリンプロモーターのコントロール下に転写因子を発現するトランスジェニックマウスと該転写因子で活性化されるプロモーターのコントロール下にSV40ラージT抗原を発現するトランスジェニックマウスを掛け合わせることによって生まれたマウスに生じた β 細胞由来と考えられる腫瘍から樹立された細胞株

上記樹立株として、 β TC-tet細胞等が知られている〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 3576 (1995)〕。上記(iv)同様、これら樹立株も、ランゲルハンス氏島に存在する特定の細胞の癌化細胞株と考えられている。

(vi) プレグルカゴンプロモーターのコントロール下にSV40ラージT抗原を発現するトランスジェニックマウスに生じたアデノーマから樹立された細胞株

上記樹立株として、 α TC1細胞〔Diabetes, 39, 406 (1990); Diabetes, 39, 415 (1990)〕、 α TC1細胞由来のシングルクローン細胞 α TC1 clone 9等が知られている。ここでSV40ラージT抗原は、ランゲルハンス氏島に存在する特定の細胞(α 細胞等)でのみ発現するため、特定の細胞のみが不死化されていると考えられる。従って、これら樹立株も、ランゲルハンス氏島に存在する特定の細胞の癌化細胞株と考えられている。

(vii) elastase-1プロモーターのコントロール下にSV40ラージT抗原を発現するトランスジェニックマウスに生じた膵臓癌から樹立された細胞株

上記細胞株として、TGP52がある〔Carcinogenesis, 15, 61 (1994)〕。ここでSV40ラージT抗原は、ランゲルハンス氏島に存在する特定の細胞でのみ発現するため、特定の細胞のみが不死化されていると考えられる。従って、この樹立株も、ランゲルハンス氏島に存在する特定の細胞の癌化細胞株と考えられている。

上記ランゲルハンス氏島の細胞より樹立した細胞株はいずれも、癌細胞あるいは癌由来の細胞であるため、正常の細胞とは異なる性質を有する可能性がある。

新たな生理活性物質、受容体、リガンド、あるいは活性ペプチドなどを探索する上では、正常の細胞の性質を保持したさらに多様な細胞株の取得が望まれる。ランゲルハンス氏島の各種細胞はお互いを制御し合っていると考えられているため、多様な細胞株を取得し、それらを共培養することで個々の細胞の役割を解析することが可能になる。

また、同じ遺伝的バックグラウンドを有するランゲルハンス氏島由来の多様な

細胞株が取得できれば、個々の細胞株の分化ステージや機能を比較解析する上でも有用である。これまでは、同じ遺伝的バックグラウンドを有する、ランゲルハンス氏島由来の多種の不死化細胞は存在しなかった。

ランゲルハンス氏島に存在する内分泌性細胞は、グルカゴン、インスリン、ソマトスタチン、膵ポリペプチドをはじめ、様々な活性ペプチドを生産していることが知られているため、該内分泌性細胞は新たな活性ペプチドを探索する上でも非常に有用なソースとなると考えられる。

内分泌細胞株または任意の遺伝子を導入した内分泌細胞から生産されるペプチドの活性を効率良く調べるためには、該ペプチドの活性を検出できる高感度で簡便なアッセイ系が必要である。新たな活性を有するペプチドや該ペプチドをコードする遺伝子を効率良く見出すためには、高感度で簡便な、多様なアッセイ系が必要となる。また、多様な内分泌細胞株をペプチドソースまたは遺伝子ソースとして用いることにより、新たな活性を有するペプチドや該ペプチドをコードする遺伝子を効率良く見出すことができると考えられる。

これまでに多くのアッセイ系が構築されている。感度のよいアッセイ系として、例えばバイオアッセイ系等をあげることができる。

バイオアッセイ系の場合、どのような細胞を使用するかにより検出感度、シグナル／ノイズ比、汎用性、および簡便性が大きく変わる。該細胞として形質転換体を使用する場合には、遺伝子導入効率がよいか、遺伝子の発現量が高いか、遺伝子の誘導発現が可能か、該誘導発現の倍率が高いか等で、アッセイ効率に大きな影響を与える。動物細胞を使用する場合には、無血清培地で培養が可能か、生育が良好な非接着性細胞（浮遊系細胞）であるか等で、アッセイ効率が大きく変わる。

活性ペプチド（リガンド）の探索に使用可能なアッセイ系の例としては、G蛋白質共役型受容体（以下、GPCRと略すこともある）を利用したバイオアッセイ系が知られている。該GPCRバイオアッセイ系により、新規リガンド、アゴニストまたはアンタゴニストが取得されている。GPCRは、 $G\alpha$ 、 $G\beta$ 、 $G\gamma$ の3種のG蛋白質（guanine nucleotide-binding protein）から構成されるヘテロ三量体G蛋白質と共役し、G蛋白質の活性化を通して細胞内にシグナルを伝達する。GPCRは7個の膜貫通領域を有することから、7回膜貫通型受容体とも呼ばれる。

該GPCRバイオアッセイ系には、細胞内Ca²⁺量の増加を検出する方法、レポーター系を用いる方法等多くの方法が知られている。

GPCRは共役するG蛋白質のサブタイプの違いによって、異なるシグナルを流す。レポーター系を用いる方法の場合、レポーター遺伝子を発現させるためのプロモーターとしてどのようなものを使用するかにより、検出できるシグナル、感度、シグナル／ノイズ比等が異なる。

プロモーターとしては、TPA応答配列 (TRE) を有するプロモーター、NFAT (nuclear factor of activated T cells) 応答性プロモーター、cAMP応答配列 (CRE) を有するプロモーター、血清応答配列 (SRE) を有するプロモーター等が利用されている。

GPCRと共役するG α の立体構造は既に明らかにされており、GPCRとの相互作用に重要であるG α 蛋白質のC末端のアミノ酸を他のG α 蛋白質の対応するアミノ酸に置換することにより、本来共役しないGPCRと共役できるようになることが知られている [Mol. Pharmacol., 57, 13 (2000)]。

例えば、G α_q のC末端の5アミノ酸をG α_i のものに置換したキメラG α 蛋白質 (G α_{q-i}) は、G α_i に共役してシグナルを流すGPCRと、G α_s のC末端の5アミノ酸をG α_q のものに置換したキメラG α 蛋白質 (G α_{s-q}) は、G α_q に共役してシグナルを流すGPCRと、G α_s のC末端の5アミノ酸をG α_i のものに置換したキメラG α 蛋白質 (G α_{s-i}) は、G α_i に共役してシグナルを流すGPCRと共役することができるようになる。

GPCRには、細胞内で過剰に発現すると、リガンドが存在しなくてもシグナルを流す、構成活性型GPCRと呼ばれるGPCRが知られている。リガンド非存在時に流れるシグナルのことを構成的活性と呼ぶ。構成活性型GPCRには、天然に存在するものと、アミノ酸の置換、欠失などの変異を導入することにより造成された変異GPCR [Mol. Pharmacol., 57, 890 (2000); W098/46995] がある。該変異GPCRは、アゴニストとの親和性が増加する場合があるため、リガンドの探索に有用である [J. Biol. Chem., 272, 1822 (1997)]。

GPCRバイオアッセイ系では、アッセイ用の細胞として、CHO細胞、COS-7細胞、293細胞、HEK293 EBNA細胞等の動物細胞、カエルのメラノフォア [Mol. Pharmacol., 57, 125 (2000)] あるいは酵母 [Trends Biotechnol., 15, 487 (1997); G protein Receptors, CRC Press, 49-68 (2000)] 等が利用されている。

上記のGPCRバイオアッセイ系は優れたアッセイ系であるが、検出感度、シグナル／ノイズ比、汎用性、簡便性、および使用する宿主・ベクター系などに関して更なる改善が求められている。

上記のようなアッセイ細胞を宿主として発現クローニングを行えば、有用な遺伝子を効率的に取得することが可能であり、これまでにレポーター遺伝子の発現を指標にして、インターフェロン γ 受容体の β 鎖やPACAP (pituitary adenylylate cyclase-activating polypeptide) 受容体の遺伝子が取得されている [Nature, 365, 170 (1993); Cell, 76, 803 (1994)]。しかし、該発現クローニング法に関してもGPCRバイオアッセイ系と同様の改善が求められている。また、構成活性型のGPCR遺伝子を発現クローニング法により取得可能であることに関する記載も示唆もない。

発明の開示

本発明は、以下の(1)～(5)を提供することを課題としている。

- (1) 哺乳動物の内分泌細胞由来の多様な細胞株。
- (2) 該細胞株を宿主として用いた、活性ペプチド前駆体遺伝子の発現クローニング系および活性ペプチドの生産法。
- (3) 該細胞株を用いた、該細胞に作用する物質の探索法や評価法。
- (4) 該細胞株を用いた有用遺伝子、有用ペプチドの探索法および取得法。
- (5) 上記の発現クローニング系で使用する高感度で簡便なGPCRリガンドのアッセイ系。

本発明は以下の(1)～(106)に関する。

- (1) 下記[1]～[5]の工程を有する、目的とする受容体のアゴニスト、アンタゴニストまたはインバースアゴニストとして作用するペプチドをコードするDNAの取得方法。

[1]任意のcDNAまたは染色体由来のDNAを内分泌細胞由来の細胞株に導入して形質転換株を取得する

[2]上記[1]の形質転換株を培養し、導入したDNAを発現させた後、該形質転換株の培養上清、細胞抽出液、膜画分、または該形質転換株自身を、目的とする受容体を発現する細胞と接触させる

[3]該受容体に基づく細胞の応答反応を検出する

[4]該形質転換株の培養上清、細胞抽出液、膜画分、または該形質転換株自身が目的の活性を示した形質転換株を選択する

[5]上記[4]の形質転換株に導入したDNAを、形質転換株に目的の活性を与えるDNAとして同定する

(2) 下記[1]～[7]の工程を有する、目的とする受容体のアゴニスト、アンタゴニストまたはインバースアゴニストとして作用するペプチドをコードするDNAの取得方法。

[1]発現ベクターを用いて作製したcDNAライブラリーを1～10000のクローンずつのプールに分ける

[2]各プールに由来するcDNAクロンの混合物を内分泌細胞由来の細胞株に導入して形質転換株を取得する

[3]上記[2]の形質転換株を各プールごとに培養して、導入したcDNAを発現させた後、該形質転換株の培養上清、細胞抽出液、膜画分、または該形質転換株自身を、プールごとに目的とする受容体を発現する細胞と接触させる

[4]該受容体に基づく細胞の応答反応をプールごとに検出する

[5]該形質転換株の培養上清、細胞抽出液、膜画分、または該形質転換株自身が目的の活性を示したプールを選択し、選択したプールを[1]よりも細かいプールに分ける

[6][2]～[5]の操作をプールが1クローンごとになるまで繰り返す

[7]形質転換株に目的の活性を与えるcDNAを同定する

(3) 任意のcDNAまたは染色体由来の遺伝子が、活性ペプチド前駆体をコードする遺伝子である、(1)または(2)に記載のDNAの取得方法。

(4) 受容体がG蛋白質共役型受容体である、(1)または(2)に記載のDNAの取得方法。

(5) G蛋白質共役型受容体がオーファンG蛋白質共役型受容体である、(4)に記載のDNAの取得方法。

(6) 内分泌細胞由来の細胞株が、SV40のラージT抗原遺伝子を発現する内分泌細胞由来の細胞株である、(1)または(2)に記載のDNAの取得方法。

(7) 内分泌細胞由来の細胞株が、SV40の温度感受性変異株のラージT抗原遺伝子

を発現する内分泌細胞由来の細胞株である、(1) または (2) に記載のDNAの取得方法。

(8) 内分泌細胞由来の細胞株が、非ヒト・トランスジェニック動物細胞由来の細胞株である、(1)、(2)、(6) または (7) に記載のDNAの取得方法。

(9) 非ヒト・トランスジェニック動物がトランスジェニックラットである (8) に記載のDNAの取得方法。

(10) SV40の温度感受性変異株がSV40tsA58である (7) に記載のDNAの取得方法。

(11) 内分泌細胞由来の細胞株が、視床下部またはランゲルハンス氏島由来の細胞株である、(1)、(2)、(6)、(7) または (8) に記載のDNAの取得方法。

(12) 内分泌細胞由来の細胞株が、レプチン受容体 (Ob-Rb) 遺伝子、プレプロニューロメディンU遺伝子、RFamide-related peptide (RFRP) プレプロ蛋白質遺伝子、プレプロオレキシン遺伝子、プレプロオピオメラノコルチン遺伝子、プレプロニューロペプチドY遺伝子、プレプロニューロペプチドFF遺伝子、プレプロコルチコトロピン放出ホルモン遺伝子、プレプロサイロトロピン放出ホルモン遺伝子、プレプログレリン遺伝子、プレプロメラニン凝集ホルモン遺伝子、cocaine-and amphetamine-regulated transcript (CART) 遺伝子、2型ニューロメディンU受容体 (NMU2R) 遺伝子、RFRP受容体遺伝子、4型メラノコルチン受容体 (MC4R) 遺伝子、1型ニューロペプチドY受容体 (NPY1R) 遺伝子、5型ニューロペプチドY受容体 (NPY5R) 遺伝子、2型ニューロペプチドFF受容体 (NPFF2) 遺伝子、1型コルチコトロピン放出ホルモン受容体 (CRHR-1) 遺伝子、2型コルチコトロピン放出ホルモン受容体 (CRHR-2) 遺伝子、グレリン受容体遺伝子、1型メラニン凝集ホルモン受容体 (MCHR1) 遺伝子、プレプロアグーチ関連ペプチド遺伝子、スルホニルウレア受容体遺伝子、毛様体神経栄養因子 (CNTF) 受容体遺伝子、1型ニューロメディンU受容体 (NMU1R) 遺伝子、1型オレキシン受容体 (OX1R) 遺伝子、2型オレキシン受容体 (OX2R) 遺伝子、1型アンジオテンシンII受容体遺伝子、ガラニン受容体、グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) 受容体遺伝子、およびグルカゴン様ペプチド-2 (GLP-2) 受容体遺伝子からなる群より選ばれる遺伝子の少なくとも1つの遺伝子を内因性に発現する視床下部由来細胞である、(1)、(2)、(6)、(7) または (8) に記載のDNAの取得方法。

(13) 内分泌細胞由来の細胞株が、レプチン受容体 (Ob-Rb)、ニューロメディン

U、RFamide-related peptide (RFRP) 蛋白質、オレキシン、オビオメラノコルチン、ニューロペプチドY、ニューロペプチドFF、コルチコトロピン放出ホルモン、サイロトロピン放出ホルモン、グレリン、メラニン凝集ホルモン、cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART)、2型ニューロメディンU受容体 (NMU2R)、RFRP受容体、4型メラノコルチン受容体 (MC4R)、1型ニューロペプチドY受容体 (NPY1R)、5型ニューロペプチドY受容体 (NPY5R)、2型ニューロペプチドFF受容体 (NPFF2)、1型コルチコトロピン放出ホルモン受容体 (CRHR-1)、2型コルチコトロピン放出ホルモン受容体 (CRHR-2)、グレリン受容体、1型メラニン凝集ホルモン受容体 (MCHR1)、アグーチ関連ペプチド、スルホニルウレア受容体、毛様体神経栄養因子 (CNTF) 受容体、1型ニューロメディンU受容体 (NMU1R)、1型オレキシン受容体 (OX1R)、2型オレキシン受容体 (OX2R)、1型アンジオテンシンII受容体、ガラニン受容体、グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) 受容体、グルカゴン様ペプチド-2 (GLP-2) 受容体、およびエンドルフィンからなる群より選ばれるペプチドの少なくとも1つのペプチドを内因性に発現する視床下部由来の細胞である、(1)、(2)、(6)、(7) または (8) に記載のDNAの取得方法。

(14) 内分泌細胞由来の細胞株の細胞が、プレプロインスリン遺伝子、プレプログルカゴン遺伝子、プレプロソマトスタチン遺伝子、プレプロ膵ポリペプチド遺伝子、プロホルモンコンベルターゼ1 (PC1) 遺伝子、プロホルモンコンベルターゼ2 (PC2) 遺伝子、グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) 受容体遺伝子、PDX1 (pancreatic-duodenal homeobox 1) 遺伝子、Pax4遺伝子、Pax6遺伝子、ニューロジェニン3遺伝子、ニューロD遺伝子、Nkx2.2遺伝子、Nkx6.1遺伝子、グルコキナーゼ遺伝子、2型グルコーストランスポーター遺伝子、ベータセルリン遺伝子、スルホニルウレア遺伝子、P2Y₁受容体遺伝子、グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) 受容体遺伝子、1型ソマトスタチン受容体遺伝子、2型ソマトスタチン受容体遺伝子、3型ソマトスタチン受容体遺伝子、4型ソマトスタチン受容体遺伝子、5型ソマトスタチン受容体遺伝子、インスリン受容体遺伝子、グルコーストランスポーター遺伝子、およびネスチン遺伝子からなる群より選ばれる遺伝子の少なくとも1つの遺伝子を内因性に発現するランゲルハンス氏島由来細胞である、(1)、(2)、(6)、(7) または (8) に記載のDNAの取得方法。

(15) 受容体を発現する細胞が、下記の[1]~[3]の少なくとも1つが染色体DNAに

組み込まれた、エプスタイン・バー・ウイルス (Epstein-Barr virus) のEBNA-1 遺伝子を発現する無血清馴化したB細胞株である、(1) または (2) に記載のDNAの取得方法。

[1]誘導発現系の構築に必要な転写因子を発現するためのDNAコンストラクト

[2]転写因子の応答配列を有するプロモーターの下流にレポーター遺伝子を連結したDNAコンストラクト

[3]G α 蛋白質またはキメラG α 蛋白質を発現するためのDNAコンストラクト

(16) B細胞株が、無血清馴化Namalwa細胞である、(15) に記載のDNAの取得方法。
(17) 無血清馴化Namalwa細胞が、Namalwa KJM-1細胞である、(16) に記載のDNAの取得方法。

(18) 誘導発現系の構築に必要な転写因子が、酵母のGal4pとエストロジェン受容体のリガンド結合領域のキメラ蛋白質である、(15) に記載のDNAの取得方法。

(19) 転写因子の応答配列が、cAMP 応答配列 (CRE)、TPA 応答配列 (TRE)、NFAT(nuclear factor of activated T cells) 応答配列、または血清応答配列 (SRE)である、(15) に記載のDNAの取得方法。

(20) レポーター遺伝子が、ホタル・ルシフェラーゼ遺伝子、ウミシイタケ・ルシフェラーゼ遺伝子、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子、 β -ラクタマーゼ遺伝子、またはグリーン・フルオレッセント・プロテイン遺伝子である、(15) に記載のDNAの取得方法。

(21) G α 蛋白質が、G α_{16} 、G α_{15} 、G α_q 、G α_{11} 、G α_8 、G α_1 、G α_0 、G α_2 、G α_{12} 、G α_{13} 、G α_{gust} 、G α_t 、およびG α_{14} からなる群より選ばれるの少なくとも1つのG α 蛋白質である、(15) に記載のDNAの取得方法。

(22) キメラG α 蛋白質が、下記の[1]～[20]からなる群より選ばれるの少なくとも1つのキメラG α 蛋白質である、(15) に記載のDNAの取得方法。

[1]G α_s のC末端5アミノ酸をG α_q のC末端5アミノ酸に置換したキメラG α 蛋白質

[2]G α_s のC末端5アミノ酸をG α_i のC末端5アミノ酸に置換したキメラG α 蛋白質

[3]G α_s のC末端5アミノ酸をG α_o のC末端5アミノ酸に置換したキメラG α 蛋白質

[4]G α_s のC末端5アミノ酸をG α_x のC末端5アミノ酸に置換したキメラG α 蛋白質

[5]G α_s のC末端5アミノ酸をG α_{12} のC末端5アミノ酸に置換したキメラG α 蛋白質

[6]G α_s のC末端5アミノ酸をG α_{13} のC末端5アミノ酸に置換したキメラG α 蛋白質

- [7] $G\alpha_s$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_{gust}$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- [8] $G\alpha_s$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_t$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- [9] $G\alpha_s$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_{14}$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- [10] $G\alpha_s$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_{16}$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- [11] $G\alpha_q$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_s$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- [12] $G\alpha_q$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_i$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- [13] $G\alpha_q$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_o$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- [14] $G\alpha_q$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_z$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- [15] $G\alpha_q$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_{12}$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- [16] $G\alpha_q$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_{13}$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- [17] $G\alpha_q$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_{gust}$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- [18] $G\alpha_q$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_t$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- [19] $G\alpha_q$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_{14}$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- [20] $G\alpha_q$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_{16}$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質

(23) 誘導発現系の構築に必要な転写因子が、酵母のGal4pとエストロジェン受容体のリガンド結合領域のキメラ蛋白質であり、転写因子の応答配列を有するプロモーターが、cAMP応答配列(CRE)を有するプロモーターであり、レポーター遺伝子が、ホタル・ルシフェラーゼ遺伝子またはウミシイタケ・ルシフェラーゼ遺伝子である、(15)に記載のDNAの取得方法。

(24) 誘導発現系の構築に必要な転写因子が、酵母のGal4pとエストロジェン受容体のリガンド結合領域のキメラ蛋白質であり、転写因子の応答配列を有するプロモーターが、cAMP応答配列(CRE)を有するプロモーターであり、レポーター遺伝子が、ホタル・ルシフェラーゼ遺伝子またはウミシイタケ・ルシフェラーゼ遺伝子であり、キメラ $G\alpha$ 蛋白質が、 $G\alpha_s$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_q$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質または $G\alpha_s$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_i$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質である、(15)に記載のDNAの取得方法。

(25) 細胞の応答反応が、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 上昇、細胞内cAMP生成、細胞内cAMP減少、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos活性化、細胞内pHの変動、細胞増殖、レポーター遺伝子の発現量、およびマーカー遺伝子の発現量からなる

群より選ばれる少なくとも1つの応答反応である、(1)または(2)に記載のDNAの取得方法。

(26) 目的とする受容体を発現する細胞との接触が、該細胞を形質転換株上に重層することによる接触である、(1)または(2)に記載のDNAの取得方法。

(27) レプチン受容体 (Ob-Rb) 遺伝子、プレプロニューロメディンU遺伝子、RFamide-related peptide (RFRP) プレプロ蛋白質遺伝子、プレプロオレキシン遺伝子、プレプロオピオメラノコルチン遺伝子、プレプロニューロペプチドY遺伝子、プレプロニューロペプチドFF遺伝子、プレプロコルチコトロピン放出ホルモン遺伝子、プレプロサイロトロピン放出ホルモン遺伝子、プレプログレリン遺伝子、プレプロメラニン凝集ホルモン遺伝子、cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) 遺伝子、2型ニューロメディンU受容体 (NMU2R) 遺伝子、RFRP受容体遺伝子、4型メラノコルチン受容体 (MC4R) 遺伝子、1型ニューロペプチドY受容体 (NPY1R) 遺伝子、5型ニューロペプチドY受容体 (NPY5R) 遺伝子、2型ニューロペプチドFF受容体 (NPFF2) 遺伝子、1型コルチコトロピン放出ホルモン受容体 (CRHR-1) 遺伝子、2型コルチコトロピン放出ホルモン受容体 (CRHR-2) 遺伝子、グレリン受容体遺伝子、1型メラニン凝集ホルモン受容体 (MCHR1) 遺伝子、プレプロアグーチ関連ペプチド遺伝子、スルホニルウレア受容体遺伝子、毛様体神経栄養因子 (CNTF) 受容体遺伝子、1型ニューロメディンU受容体 (NMU1R) 遺伝子、1型オレキシン受容体 (OX1R) 遺伝子、2型オレキシン受容体 (OX2R) 遺伝子、1型アンジオテンシンII受容体遺伝子、ガラニン受容体遺伝子、グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) 受容体遺伝子、およびグルカゴン様ペプチド-2 (GLP-2) 受容体遺伝子からなる群より選ばれる遺伝子の少なくとも1つの遺伝子を内因性に発現する視床下部由来の細胞株。

(28) レプチン受容体 (Ob-Rb)、ニューロメディンU、RFamide-related peptide (RFRP) 蛋白質、オレキシン、オピオメラノコルチン、ニューロペプチドY、ニューロペプチドFF、コルチコトロピン放出ホルモン、サイロトロピン放出ホルモン、グレリン、メラニン凝集ホルモン、cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART)、2型ニューロメディンU受容体 (NMU2R)、RFRP受容体、4型メラノコルチン受容体 (MC4R)、1型ニューロペプチドY受容体 (NPY1R)、5型ニューロペプチドY受容体 (NPY5R)、2型ニューロペプチドFF受容

体 (NPFF2)、1型コルチコトロピン放出ホルモン受容体 (CRHR-1)、2型コルチコトロピン放出ホルモン受容体 (CRHR-2)、グレリン受容体、1型メラニン凝集ホルモン受容体 (MCHR1)、アグーチ関連ペプチド、スルホニルウレア受容体、毛様体神経栄養因子 (CNTF) 受容体、1型ニューロメディンU受容体 (NMU1R)、1型オレキシン受容体 (OX1R)、2型オレキシン受容体 (OX2R)、1型アンジオテンシンII受容体、ガラニン受容体、グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) 受容体、グルカゴン様ペプチド-2 (GLP-2) 受容体、およびエンドルフィンからなる群より選ばれるペプチドの少なくとも1つのペプチドを内因性に発現する視床下部由来の細胞株。

(29) 細胞株が、SV40のラージT抗原遺伝子を発現する細胞株である、(27) または (28) に記載の細胞株。

(30) 細胞株が、SV40の温度感受性変異株のラージT抗原遺伝子を発現する細胞株である、(27) または (28) に記載の細胞株。

(31) 細胞株が、非ヒト・トランスジェニック動物細胞由来の細胞株である、(27) ~ (30) のいずれか1項に記載の細胞株。

(32) SV40の温度感受性変異株のラージT抗原遺伝子を導入した非ヒト・トランスジェニック動物の視床下部またはランゲルハンス氏島から得られる不死化した細胞株。

(33) ランゲルハンス氏島から得られる不死化した細胞株が、プレプロインスリン遺伝子、プレプログルカゴン遺伝子、プレプロソマトスタチン遺伝子、プレプロ膵ポリペプチド遺伝子、プロホルモンコンベルターゼ1 (PC1) 遺伝子、プロホルモンコンベルターゼ2 (PC2) 遺伝子、グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) 受容体遺伝子、PDX1 (pancreatic-duodenal homeobox 1) 遺伝子、Pax4遺伝子、Pax6遺伝子、ニューロジェニン3遺伝子、ニューロD遺伝子、Nkx2.2遺伝子、Nkx6.1遺伝子、グルコキナーゼ遺伝子、2型グルコーストランスポーター遺伝子、ベータセルリン遺伝子、スルホニルウレア遺伝子、P2Y₁受容体遺伝子、グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) 受容体遺伝子、1型ソマトスタチン受容体遺伝子、2型ソマトスタチン受容体遺伝子、3型ソマトスタチン受容体遺伝子、4型ソマトスタチン受容体遺伝子、5型ソマトスタチン受容体遺伝子、インスリン受容体遺伝子、グルコーストランスポーター遺伝子、およびネスチン遺伝子からなる群より選ばれる遺伝子の少なくとも1つの遺伝子を内因性に発現する細胞株である、(32) に記載の細胞

株。

(34) SV40の温度感受性変異株がSV40tsA58である (30) または (32) に記載の細胞株。

(35) 非ヒト・トランスジェニック動物がトランスジェニックラットである (31) または (32) に記載の細胞株。

(36) 下記[1]および[2]の工程を有する、ペプチドの製造方法。

[1] (27) ~ (35) のいずれか 1 項に記載の細胞株を培養し、該細胞株が内在的に発現しているペプチドを培養物中に生成蓄積させる

[2] 上記[1]で得られた培養物から該ペプチドを採取する

(37) 下記[1]~[3]の工程を有する、ペプチドの製造方法。

[1] (27) ~ (35) のいずれか 1 項に記載の細胞株を宿主細胞として用い、該宿主細胞に目的とするペプチドをコードするDNAを導入し、形質転換株を取得する

[2] 該形質転換株を培養し、培養物中にペプチドを生成蓄積させる

[3] 上記[2]で得られた培養物から該ペプチドを採取する

(38) 培養を、SV40の温度感受性変異株のラージT抗原の活性を抑制しない温度で行うことを特徴とする、(36) または (37) に記載の製造法。

(39) 製造において、無血清培地、2%以下の血清を含む培地、または無血清培地にN-サプリメントを添加した培地を用いて培養を行う工程を有することを特徴とする、(36) ~ (38) のいずれか 1 項に記載の製造法。

(40) 製造において、5~30mmol/Lのグルコースを含有する培地を用いて培養を行う工程を有することを特徴とする、(36) ~ (39) のいずれか 1 項に記載の製造法。

(41) 製造において、宿主細胞で発現されている、受容体、トランスポーターまたはチャネルの、アゴニストまたはアンタゴニストを添加した培地を用いて培養を行う工程を有することを特徴とする、(36) ~ (40) のいずれか 1 項に記載の製造法。

(42) 受容体が、G蛋白質共役型受容体、核内受容体、増殖因子受容体、スルホニルウレア受容体、ciliary neurotrophic factor受容体、レプチン受容体、サイトカイン受容体、またはスルホニルウレア受容体であることを特徴とする、(41) に記載の製造法。

(43) トランスポーターがグルコーストランスポーターであることを特徴とする、(41)に記載の製造法。

(44) チャネルが、Caチャネル、Kチャネル、ClチャネルまたはNaチャネルであることを特徴とする、(41)に記載の製造法。

(45) 製造において、宿主細胞で発現されている受容体のシグナルを代替することのできる物質を添加した培地を用いて培養を行う工程を有することを特徴とする、(36)～(44)のいずれか1項に記載の製造法。

(46) 受容体のシグナルを代替することのできる物質が、アデニレートシクラーゼ、プロテインキナーゼ、ホスホジエステラーゼ、低分子量G蛋白質、細胞内cAMPまたは細胞内Ca²⁺含量を変動する物質、フォルスコリン、8-ブロモ-サイクリックAMP (8-Br-cAMP)、ホルボール12-ミリステート13-アセテート (PMA)、イオノマイシンおよび3-イソブチル-1-メチルキサンチンよりなる群より選ばれる物質の少なくとも1つの物質である、(45)に記載の製造法。

(47) 製造において、ラミニンまたはゼラチンをコートしたディッシュ上で培養を行う工程を有することを特徴とする、(36)～(46)のいずれか1項に記載の製造法。

(48) スクシニル化コンカナバリンAを添加した培地を用いて培養を行うことを特徴とする、(36)～(46)のいずれか1項に記載の製造法。

(49) アクチビン、グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1)、フォリスタチン、グルコース、肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor)、上皮増殖因子 (epidermal growth factor)、ニコチンアミド、ベータセルリン、副甲状腺ホルモン関連ペプチド (parathyroid hormone-related peptide)、甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン (thyrotropin-releasing hormone)、血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor)、islet neogenesis-associated protein、血小板由来増殖因子 (Platelet-derived growth factor)、インシュリン様増殖因子I (insulin-like growth factor I)、繊維芽細胞増殖因子 (fibroblast growth factor)、神経成長因子 (nerve growth factor) およびReg蛋白質からなる群より選ばれる物質の少なくとも1つの物質を添加した培地を用いて培養を行うことを特徴とする、(36)～(48)のいずれか1項に記載の製造法。

(50) 培養物中に活性ペプチドを生成蓄積させた後に分泌刺激剤を添加すること

を特徴とする、(36)～(49)のいずれか1項に記載の製造法。

(51) 分泌刺激剤が、カリウム、グルコース、TolbutamideまたはATPである、

(50) に記載の製造法。

(52) 一種類以上のペプチドをコードするDNAを宿主細胞に導入し、複数のペプチドを製造することを特徴とする、(37)～(51)のいずれか1項に記載の製造法。

(53) 下記[1]～[4]の工程を有する、目的とする受容体のアゴニスト、アンタゴニストまたはインバースアゴニストとして作用するペプチドの検出または取得方法。

[1] (1)～(26)のいずれか1項に記載の方法で、目的とする受容体のアゴニスト、アンタゴニストまたはインバースアゴニストとして作用するペプチドをコードするDNAを取得する

[2] 該DNAがコードするペプチドまたは部分ペプチドを、目的とする受容体を発現する細胞と接触させる

[3] 該受容体に基づく細胞の応答反応を検出する

[4] 上記[3]で応答反応を与えることの示されたペプチドまたは部分ペプチドを同定する

(54) 下記[1]～[4]の工程を有する、目的とする受容体のアゴニスト、アンタゴニストまたはインバースアゴニストとして作用するペプチドの検出または取得方法。

[1] (36)～(52)のいずれか1項に記載の製造方法でペプチドを取得する

[2] 該ペプチドを、目的とする受容体を発現する細胞と接触させる

[3] 該受容体に基づく細胞の応答反応を検出する

[4] 上記[3]で応答反応を与えることの示されたペプチドを同定する

(55) 受容体がG蛋白質共役型受容体である、(53)または(54)に記載の検出または取得方法。

(56) G蛋白質共役型受容体がオーファンG蛋白質共役型受容体である、(55)に記載の検出または取得方法。

(57) 受容体を発現する細胞が、下記の[1]～[3]の少なくとも1つが染色体DNAに組み込まれた、エプスタイン・バー・ウイルス (Epstein-Barr virus) のEBNA-1遺伝子を発現する無血清馴化したB細胞株である、(53)または(54)に記載の検

出または取得方法。

[1]誘導発現系の構築に必要な転写因子を発現するためのDNAコンストラクト[2]転写因子の応答配列を有するプロモーターの下流にレポーター遺伝子を連結したDNAコンストラクト[3] $G\alpha$ 蛋白質またはキメラ $G\alpha$ 蛋白質を発現するためのDNAコンストラクト

(58) B細胞株が、無血清馴化Namalwa細胞である、(57)に記載の検出または取得方法。

(59) 無血清馴化Namalwa細胞が、Namalwa KJM-1細胞である、(58)に記載の検出または取得方法。

(60) 誘導発現系の構築に必要な転写因子が、酵母のGal4pとエストロゲン受容体のリガンド結合領域のキメラ蛋白質である、(57)に記載の検出または取得方法。

(61) 転写因子の応答配列が、cAMP 応答配列(CRE)、TPA 応答配列(TRE)、NFAT(nuclear factor of activated T cells) 応答配列、または血清応答配列(SRE)である、(57)に記載の検出または取得方法。

(62) レポーター遺伝子が、ホタル・ルシフェラーゼ遺伝子、ウミシイタケ・ルシフェラーゼ遺伝子、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子、 β -ラクタマーゼ遺伝子、またはグリーン・フルオレッセント・プロテイン遺伝子である、(57)に記載の検出または取得方法。

(63) $G\alpha$ 蛋白質が、 $G\alpha_{16}$ 、 $G\alpha_{15}$ 、 $G\alpha_q$ 、 $G\alpha_{11}$ 、 $G\alpha_9$ 、 $G\alpha_i$ 、 $G\alpha_o$ 、 $G\alpha_x$ 、 $G\alpha_{12}$ 、 $G\alpha_{13}$ 、 $G\alpha_{\text{gust}}$ 、 $G\alpha_t$ 、および $G\alpha_{14}$ からなる群より選ばれるの少なくとも1つの $G\alpha$ 蛋白質である、(57)に記載の検出または取得方法。

(64) キメラ $G\alpha$ 蛋白質が、下記の[1]～[20]からなる群より選ばれるの少なくとも1つのキメラ $G\alpha$ 蛋白質である、(57)に記載の検出または取得方法。

- [1] $G\alpha_9$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_q$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- [2] $G\alpha_9$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_i$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- [3] $G\alpha_9$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_o$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- [4] $G\alpha_9$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_x$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- [5] $G\alpha_9$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_{12}$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- [6] $G\alpha_9$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_{13}$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質

- [7] $G\alpha_s$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_{gust}$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- [8] $G\alpha_s$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_t$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- [9] $G\alpha_s$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_{14}$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- [10] $G\alpha_s$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_{16}$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- [11] $G\alpha_q$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_s$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- [12] $G\alpha_q$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_i$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- [13] $G\alpha_q$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_o$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- [14] $G\alpha_q$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_r$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- [15] $G\alpha_q$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_{12}$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- [16] $G\alpha_q$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_{13}$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- [17] $G\alpha_q$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_{gust}$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- [18] $G\alpha_q$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_t$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- [19] $G\alpha_q$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_{14}$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- [20] $G\alpha_q$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_{16}$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質

(65) 誘導発現系の構築に必要な転写因子が、酵母のGal4pとエストロジェン受容体のリガンド結合領域のキメラ蛋白質であり、転写因子の応答配列を有するプロモーターが、cAMP応答配列(CRE)を有するプロモーターであり、レポーター遺伝子が、ホタル・ルシフェラーゼ遺伝子またはウミシイタケ・ルシフェラーゼ遺伝子である、(57) に記載の検出または取得方法。

(66) 誘導発現系の構築に必要な転写因子が、酵母のGal4pとエストロジェン受容体のリガンド結合領域のキメラ蛋白質であり、転写因子の応答配列を有するプロモーターが、cAMP応答配列(CRE)を有するプロモーターであり、レポーター遺伝子が、ホタル・ルシフェラーゼ遺伝子またはウミシイタケ・ルシフェラーゼ遺伝子であり、キメラ $G\alpha$ 蛋白質が、 $G\alpha_s$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_q$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質または $G\alpha_s$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_i$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質である、(57) に記載の検出または取得方法。

(67) 細胞の応答反応が、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 上昇、細胞内cAMP生成、細胞内cAMP減少、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos活性化、細胞内pHの変動、細胞増殖、レポーター遺伝子の発現量、およびマーカー遺伝子の発現量からなる

群より選ばれる少なくとも1つの応答反応である、(53)または(54)に記載の検出または取得方法。

(68) 下記の[1]~[3]の少なくとも1つが染色体DNAに組み込まれた、エプスタイン・バー・ウイルス (Epstein-Barr virus) のEBNA-1遺伝子を発現する無血清馴化したB細胞株由来の細胞株。

[1]誘導発現系の構築に必要な転写因子を発現するためのDNAコンストラクト

[2]転写因子の応答配列を有するプロモーターの下流にレポーター遺伝子を連結したDNAコンストラクト

[3]G α 蛋白質またはキメラG α 蛋白質を発現するためのDNAコンストラクト

(69) 細胞株が、無血清馴化Namalwa細胞である、(68)に記載の細胞株。

(70) 無血清馴化Namalwa細胞が、Namalwa KJM-1細胞である、(69)に記載の細胞株。

(71) 誘導発現系の構築に必要な転写因子が、酵母のGal4pとエストロジェン受容体のリガンド結合領域のキメラ蛋白質である、(68)に記載の細胞株。

(72) 転写因子の応答配列が、cAMP応答配列(CRE)、TPA応答配列(TRE)、NFAT(nuclear factor of activated T cells)応答配列、または血清応答配列(SRE)である、(68)に記載の細胞株。

(73) レポーター遺伝子が、ホタル・ルシフェラーゼ遺伝子、ウミシイタケ・ルシフェラーゼ遺伝子、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子、 β -ラクタマーゼ遺伝子、またはグリーン・フルオレッセント・プロテイン遺伝子である、(68)に記載の細胞株。

(74) G α 蛋白質が、G α_{16} 、G α_{15} 、G α_q 、G α_{11} 、G α_s 、G α_i 、G α_o 、G α_2 、G α_{12} 、G α_{13} 、G α_{gust} 、G α_t 、およびG α_{14} からなる群より選ばれるの少なくとも1つのG α 蛋白質である、(68)に記載の細胞株。

(75) キメラG α 蛋白質が、下記の[1]~[20]からなる群より選ばれるの少なくとも1つのキメラG α 蛋白質である、(68)に記載の細胞株。

[1]G α_s のC末端5アミノ酸をG α_q のC末端5アミノ酸に置換したキメラG α 蛋白質

[2]G α_s のC末端5アミノ酸をG α_i のC末端5アミノ酸に置換したキメラG α 蛋白質

[3]G α_s のC末端5アミノ酸をG α_o のC末端5アミノ酸に置換したキメラG α 蛋白質

[4]G α_s のC末端5アミノ酸をG α_x のC末端5アミノ酸に置換したキメラG α 蛋白質

- [5] $G\alpha_s$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_{12}$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- [6] $G\alpha_s$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_{13}$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- [7] $G\alpha_s$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_{gust}$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- [8] $G\alpha_s$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_t$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- [9] $G\alpha_s$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_{14}$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- [10] $G\alpha_s$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_{16}$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- [11] $G\alpha_q$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_s$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- [12] $G\alpha_q$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_i$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- [13] $G\alpha_q$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_o$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- [14] $G\alpha_q$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_z$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- [15] $G\alpha_q$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_{12}$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- [16] $G\alpha_q$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_{13}$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- [17] $G\alpha_q$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_{gust}$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- [18] $G\alpha_q$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_t$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- [19] $G\alpha_q$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_{14}$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- [20] $G\alpha_q$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_{16}$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質

(76) 誘導発現系の構築に必要な転写因子が、酵母のGal4pとエストロジェン受容体のリガンド結合領域のキメラ蛋白質であり、転写因子の応答配列を有するプロモーターが、cAMP応答配列(CRE)を有するプロモーターであり、レポーター遺伝子が、ホタル・ルシフェラーゼ遺伝子またはウミシイタケ・ルシフェラーゼ遺伝子である、(68)に記載の細胞株。

(77) 誘導発現系の構築に必要な転写因子が、酵母のGal4pとエストロジェン受容体のリガンド結合領域のキメラ蛋白質であり、転写因子の応答配列を有するプロモーターが、cAMP応答配列(CRE)を有するプロモーターであり、レポーター遺伝子が、ホタル・ルシフェラーゼ遺伝子またはウミシイタケ・ルシフェラーゼ遺伝子であり、キメラ $G\alpha$ 蛋白質が、 $G\alpha_s$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_q$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質または $G\alpha_s$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_i$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質である、(68)に記載の細胞株。

(78) 下記[1]～[4]の工程を有する、被検物質に反応するペプチドをコードするDNAの取得方法。

[1] (68) ~ (77) のいずれか 1 項に記載の細胞株に、任意のcDNAまたは染色体由来のDNAを導入して形質転換株を取得する

[2] 導入したcDNAまたは染色体DNAを発現させた形質転換株を用いて、被検物質の存在下で該形質転換株の応答反応を測定する

[3] 導入したcDNAまたは染色体DNAを発現させた形質転換株を用いて、被検物質の非存在下で該形質転換株の応答反応を測定する

[4] 上記[2]と[3]の応答反応を比較し、異なる応答反応を示す形質転換株を選択し、該株に導入したDNAを同定する

(79) 下記[1]~[7]の工程を有する、被検物質に反応するペプチドをコードするDNAの取得方法。

[1] 発現ベクターを用いて作製したcDNAライブラリーを1~10000のクローンずつのプールに分ける

[2] 各プールに由来するcDNAクローンの混合物を、(68) ~ (77) のいずれか 1 項に記載の細胞株に導入して形質転換株を取得する

[3] 各プールごとに、導入したcDNAを発現させた形質転換株を用いて、被検物質の存在下で該形質転換株の応答反応を測定する

[4] 各プールごとに、導入したcDNAを発現させた形質転換株を用いて、被検物質の非存在下で該形質転換株の応答反応を測定する

[5] 上記[3]と[4]の応答反応を比較し、異なる応答反応を示すプールを選択し、選択したプールを[1]よりも細かいプールに分ける

[6] [2]~[5]の操作をプールが1クローンごとになるまで繰り返す

[7] 被検物質の存在下と非存在下で異なる応答反応を示す形質転換株を同定し、該株に導入したDNAを同定する

(80) 細胞の応答反応が、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺上昇、細胞内cAMP生成、細胞内cAMP減少、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos活性化、細胞内pHの変動、細胞増殖、レポーター遺伝子の発現量、およびマーカー遺伝子の発現量からなる群より選ばれる少なくとも 1 つの応答反応である、(78) または (79) に記載のDNAの取得方法。

(81) 被検物質が、(27) ~ (35) のいずれか 1 項に記載の細胞株を培養するこ

とにより得られる被検物質である、(78)または(79)に記載のDNAの取得方法。

(82) SV40の温度感受性変異株のラージT抗原の活性を抑制または消失させる温度で培養を行うことを特徴とする、(78)～(81)のいずれか1項に記載のDNAの取得方法。

(83) 下記[1]～[5]の工程を有する、ペプチドをコードするDNAの取得方法。

[1] (68)～(77)のいずれか1項に記載の細胞株から選ばれる、転写因子の応答配列を有するプロモーターの下流にレポーター遺伝子を連結したDNAコンストラクトが染色体DNAに組み込まれた細胞株を宿主細胞として選択する

[2] 該宿主細胞に、任意のcDNAまたは染色体由来のDNAを導入して形質転換株を取得する

[3] 上記[2]で取得された形質転換株において、導入したcDNAまたはDNAを発現させたときの、レポーター遺伝子の発現量を測定する

[4] 宿主細胞における、あるいは上記[2]で取得された形質転換株において、導入したcDNAまたはDNAを発現させていないときの、レポーター遺伝子の発現量を測定する

[5] 上記[3]と[4]のレポーター遺伝子の発現量を比較し、異なるレポーター遺伝子の発現量を示す形質転換株を選択し、該株に導入したDNAを同定する

(84) 下記[1]～[8]の工程を有する、ペプチドをコードするDNAの取得方法。

[1] 誘導発現ベクターを用いて作製したcDNAライブラリーを1～10000のクローンずつのプールに分ける

[2] (68)～(77)のいずれか1項に記載の細胞株から選ばれる、転写因子の応答配列を有するプロモーターの下流にレポーター遺伝子を連結したDNAコンストラクトが染色体DNAに組み込まれた細胞株を宿主細胞として選択する

[3] 上記[1]で分けた、各プールに由来するcDNAクロンの混合物を、上記[2]で取得した宿主細胞に導入して、各プールごとに形質転換株を取得する

[4] 上記[3]の各プールごとの形質転換株において、導入したcDNAを発現させたときの、レポーター遺伝子の発現量を測定する

[5] 上記[3]の各プールごとの形質転換株において、導入したcDNAを発現させないときの、レポーター遺伝子の発現量を測定する

[6] 上記[4]および[5]のレポーター遺伝子の発現量をプールごとに比較し、[4]の

レポーター遺伝子の発現量の多いプールの形質転換株を選択し、選択したプールを[1]よりも細かいプールに分ける

[7]上記[2]～[6]の操作をプールが1クローンごとになるまで繰り返す

[8]導入したcDNAを、発現させないときよりも発現させたときのレポーター遺伝子の発現量の多い形質転換株を同定し、該株に導入したDNAを同定する

(85) ペプチドが、受容体、転写因子、シグナル伝達分子、または酵素である、

(78)、(79)、(83)または(84)に記載のDNAの取得方法。

(86) 受容体がG蛋白質共役型受容体である、(85)に記載のDNAの取得方法。

(87) 受容体が構成活性型のG蛋白質共役型受容体である、(85)に記載のDNAの取得方法。

(88) G蛋白質共役型受容体がオーファンG蛋白質共役型受容体である、(86)または(87)に記載のDNAの取得方法。

(89) ペプチドが、転写因子の応答配列を有するプロモーターの活性を増加させる活性を有する転写因子、シグナル伝達分子、または酵素である、(78)、(79)、(83)または(84)に記載のDNAの取得方法。

(90) cDNAが変異G蛋白質共役型受容体をコードするランダム変異導入cDNA、ペプチドが構成活性型変異G蛋白質共役型受容体あることを特徴とする、(78)、(79)、(83)または(84)に記載のDNAの取得方法。

(91) ランダム変異を導入する部位が、G蛋白質共役型受容体の第3膜貫通領域の後半から第2細胞内領域の前半部分あるいは第3細胞内領域の後半から第6膜貫通領域の前半部分であることを特徴とする、(90)に記載のDNAの取得方法。

(92) ランダム変異を導入する部位が、G蛋白質共役型受容体における保存アミノ酸残基の一つである第6膜貫通領域中に存在するプロリン残基もしくは該プロリン残基に相応するアミノ酸残基よりN末側に20残基目または22残基目のアミノ酸であることを特徴とする、(90)または(91)に記載のDNAの取得方法。

(93) (90)～(92)のいずれか1項に記載の方法を用いて取得される構成活性型変異G蛋白質共役型受容体。

(94) G蛋白質共役型受容体における保存アミノ酸残基の一つである第6膜貫通領域中に存在するプロリン残基もしくは該プロリン残基に相応するアミノ酸残基よりN末側に20残基目または22残基目のアミノ酸に変異を有する構成活性型変異G蛋

白質共役型受容体。

(95) OGR1のN末端より221番目のセリンをアスパラギンに置換した構成活性型変異G蛋白質共役型受容体、OGR1のN末端より118番目のアスパラギン酸をアラニンに置換した構成活性型変異G蛋白質共役型受容体、OGR1のN末端より118番目のアスパラギン酸をアラニンに、かつ221番目のセリンをアスパラギンに置換した構成活性型変異G蛋白質共役型受容体、RE2のN末端より124番目のアスパラギン酸をアラニンに置換した構成活性型変異G蛋白質共役型受容体、GPR35のN末端より113番目のアスパラギン酸をアラニンに置換した構成活性型変異G蛋白質共役型受容体、GPCR25のN末端より111番目のアスパラギン酸をアラニンに置換した構成活性型変異G蛋白質共役型受容体、PGM0334のN末端より135番目のグルタミン酸をフェニルアラニン、グルタミンまたはアラニンに置換した構成活性型変異G蛋白質共役型受容体、PGM0334のN末端より259番目のアスパラギン酸をセリンに置換した構成活性型変異G蛋白質共役型受容体、GPR43のN末端より217番目のアルギニンをプロリンに置換した構成活性型変異G蛋白質共役型受容体、およびGPR43のN末端より217番目のアルギニンをプロリンに、かつ106番目のグルタミン酸をアスパラギン酸に置換した構成活性型変異G蛋白質共役型受容体からなる群より選ばれる構成活性型変異G蛋白質共役型受容体。

(96) 1型メラノコルチン受容体 (MC1R) および、proadrenomedullin N-20 terminal peptide (PAMP)またはPAMPのN末端から9~20番目のアミノ酸残基からなるペプチドを用いた、MC1Rのアンタゴニストの探索法または取得法。

(97) オーファンG蛋白質共役型受容体GPR43および、酢酸、プロピオン酸、酢酸塩、またはプロピオン酸塩を用いた、GPR43のアンタゴニストの探索法または取得法。

(98) オーファンG蛋白質共役型受容体GPR41および、シクロプロパンカルボン酸、プロピオン酸、シクロプロパンカルボン酸塩、またはプロピオン酸塩を用いた、GPR41のアンタゴニストの探索法または取得法。

(99) オーファンG蛋白質共役型受容体G10dおよび、 α -メラノサイト刺激ホルモンまたは副腎皮質刺激ホルモンを用いた、G10dのアンタゴニストの探索法または取得法。

(100) 下記[1]~[4]の工程を有する、G蛋白質共役型受容体のアゴニストの取得

法。

[1] (68) ~ (77) のいずれか 1 項に記載の細胞株に、任意のG蛋白質共役型受容体をコードするDNAを導入して形質転換株を取得する

[2] 導入したDNAを発現させた形質転換株を用いて、被検物質の存在下で該形質転換株の応答反応を測定する

[3] 導入したDNAを発現させた形質転換株を用いて、被検物質の非存在下で該形質転換株の応答反応を測定する

[4] 上記[2]と[3]を比較し、応答反応の変化を誘発する被検物質をアゴニストとして取得する

(101) 下記[1]~[4]の工程を有する、G蛋白質共役型受容体のアンタゴニストの取得法。

[1] (68) ~ (77) のいずれか 1 項に記載の細胞株に、任意のG蛋白質共役型受容体をコードするDNAを導入して形質転換株を取得する

[2] 導入したDNAを発現させた形質転換株を用いて、該G蛋白質共役型受容体のアゴニストの存在下で該形質転換株の応答反応を測定する

[3] 導入したDNAを発現させた形質転換株を用いて、該G蛋白質共役型受容体のアゴニストと被検物質の存在下で該形質転換株の応答反応を測定する

[4] アゴニストに基づく該形質転換株の応答反応を消失させる被検物質をアンタゴニストとして取得する

(102) 細胞の応答反応が、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺上昇、細胞内cAMP生成、細胞内cAMP減少、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos活性化、細胞内pHの変動、細胞増殖、レポーター遺伝子の発現量、およびマーカー遺伝子の発現量からなる群より選ばれる少なくとも 1 つの応答反応である、(100) または (101) に記載のG蛋白質共役型受容体のアゴニストまたはアンタゴニストの取得法。

(103) 下記[1]~[5]の工程を有する、G蛋白質共役型受容体のアンタゴニストまたはインバースアゴニストの取得法。

[1] (68) ~ (77) のいずれか 1 項に記載の細胞株から選ばれる、転写因子の応答配列を有するプロモーターの下流にレポーター遺伝子を連結したDNAコンストラクトが染色体DNAに組み込まれた細胞株を宿主細胞として選択する

[2]該宿主細胞に、任意の構成活性型G蛋白質共役型受容体をコードするDNAを導入して形質転換株を取得する

[3]被検物質の非存在下、導入したDNAを発現させた形質転換株でのレポーター遺伝子の発現量を測定する

[4]被検物質の存在下、導入したDNAを発現させた形質転換株でのレポーター遺伝子の発現量を測定する

[5]上記[3]および[4]のレポーター遺伝子の発現量を比較し、レポーター遺伝子の発現量を低下させる被検物質を、[2]のG蛋白質共役型受容体のアンタゴニストまたはインバースアゴニストとして取得する

(104) 下記[1]～[4]の工程を有する、転写因子、シグナル伝達分子および酵素からなる群より選ばれるペプチドの活性化剤または阻害剤の取得法。

[1] (68) ～ (77) のいずれか1項に記載の細胞株に、任意の転写因子、シグナル伝達分子および酵素からなる群より選ばれるペプチドをコードするDNAを導入して形質転換株を取得する

[2]導入したDNAを発現させた形質転換株を用いて、被検物質の非存在下で該形質転換株の応答反応を測定する

[3]導入したDNAを発現させた形質転換株を用いて、被検物質の存在下で該形質転換株の応答反応を測定する

[4]上記[2]と[3]を比較し、応答反応を変動させる被検物質を、該ペプチドの活性化剤または阻害剤として取得する

(105) 細胞の応答反応が、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺上昇、細胞内cAMP生成、細胞内cAMP減少、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos活性化、細胞内pHの変動、細胞増殖、レポーター遺伝子の発現量、およびマーカー遺伝子の発現量からなる群より選ばれる少なくとも1つの応答反応である、(104)に記載の取得法。

(106) 宿主細胞として(68)～(77)のいずれか1項に記載の細胞株を、ベクターとして任意のプロモーターとエプスタイン・バー・ウイルス(Epstein-Barr virus)のoriPを有する発現ベクターを用いることを特徴とする、宿主・ベクター系。

(107) 任意のプロモーターがGal4p応答性の誘導発現プロモーターである、(106)

)に記載の宿主・ベクター系。

(108) 発現ベクターが、pAMo、pAMo-nd、pAMo-d、pAGal9-nd、またはpAGal9-dであることを特徴とする、(106)または(107)に記載の宿主・ベクター系。

本明細書において、ペプチドとは2つ以上のアミノ酸がペプチド結合で連結した物質を意味し、ポリペプチド、オリゴペプチドを包含する。

[I] 活性ペプチド前駆体遺伝子の発現クローニング系および活性ペプチドの効率的な生産系の構築

活性ペプチド前駆体遺伝子の発現クローニング系および活性ペプチドの効率的な生産系は以下のようにして構築することができる。

1. 内分泌細胞由来の株化細胞の取得

活性ペプチドの前駆体からのプロセシング様式やプロセシング後の修飾は、各ペプチドによって異なり多様である。MIN6等の既存の内分泌細胞株を宿主として利用することもできるが、活性ペプチドの前駆体遺伝子を宿主細胞に導入して、活性ペプチドを効率的に生産させたり、発現したペプチドの活性を指標に該前駆体遺伝子をクローニングするためには、多種類の内分泌細胞株を取得し、その中から該活性ペプチドに適したプロセシング酵素や修飾酵素を発現している細胞を選択して宿主として利用するのが望ましい。内分泌細胞株は下記方法により樹立することができる。

(1) 内分泌細胞由来の株化細胞の樹立

本発明の内分泌細胞由来の株化細胞は、癌遺伝子を導入した非ヒト・トランスジェニック動物由来の内分泌細胞を含有する組織から細胞を単離し、培養することにより樹立することができる。

非ヒト・トランスジェニック動物として、トランスジェニックマウス、トランスジェニックラット、トランスジェニックブタ、トランスジェニックウサギ等をあげることができる。

癌遺伝子としては、SV40、アデノウイルス等ウイルス由来の癌遺伝子をあげることができ、例えば、SV40のラージT抗原遺伝子、アデノウイルスのE1A、E1B等をあげることができる。具体的には、温度感受性変異株SV40tsA58由来のラージT抗原遺伝子、アデノウイルス2とアデノウイルス5のハイブリッドのE1A 12S等をあげることができる。優良な株化細胞を樹立するためにはSV40tsA58のラージT抗原遺

伝子を用いることが好ましい。癌遺伝子を内分泌細胞で発現させるためには、癌遺伝子産物をコードする領域の上流に内分泌細胞で働く適当なプロモーターが存在することが必要である。プロモーターとしては、ウイルス由来の癌遺伝子自体の内在性のプロモーター、内分泌細胞で発現する動物由来の遺伝子のプロモーター等を用いることもできる。例えば、SV40tsA58のラージT抗原遺伝子の内在性プロモーター、H-2K^bクラスIプロモーター等を用いることができる。

SV40tsA58のラージT抗原遺伝子を導入したトランスジェニックマウスは、特開平05-292958、Jpn. J. Cancer Res., 82, 1344 (1991)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 5096 (1991)に記載の方法により、作製することができる。またSV40tsA58のラージT抗原遺伝子を導入したトランスジェニックラットは特開2000-228930またはExp. Anim., 48, 255 (1999)に記載の方法により作製することができる。具体的には、SV40tsA58の全ゲノムDNAを制限酵素BamHIで開環してプラスミドpBR322に挿入したプラスミドSVtsA58ori(-)-2〔Cytotechnology 7, 165 (1991)〕を制限酵素BamHIで切断してベクター部位を除去することによって、SV40tsA58のラージT抗原遺伝子を含むDNA (5,240 bp)を調製する。該DNAにはSV40tsA58のラージT抗原遺伝子のプロモーターが内在するため、該DNAを導入された体細胞においてSV40tsA58のラージT抗原遺伝子が発現することになる。ラットの全能性細胞である前核期受精卵の雄性前核に、上記のSV40tsA58のラージT抗原遺伝子を含むDNAをマイクロインジェクションして得られる卵子を仮親の卵管に移植して産仔を得た後、注入した該遺伝子を持つ産仔を選出し、安定的に該遺伝子が組み込まれた個体を得ることで、個体発生時にSV40tsA58のラージT抗原遺伝子が各組織の細胞の染色体に組み込まれたトランスジェニックラットを効率よく作出することができる。

癌遺伝子を導入した非ヒト・トランスジェニック動物由来の内分泌細胞を含有する組織から細胞を単離する方法としては、公知の方法を用いることができる。

例えば、視床下部由来の細胞は、J. Pharmacol. Toxicol. Method. 36, 45-52 (1996)等に記載の酵素法により、ランゲルハンス氏島細胞は、Diabetes, 46, 1755 (1997)等に記載の方法により、単離することができる。

単離した細胞の培養は、通常の動物細胞の培養方法に準じて実施することができる。

該細胞を培養するための培地として、一般に使用されているRPMI1640培地〔J. Am. Med. Assoc., 199, 519 (1967)〕、EagleのMEM培地〔Science, 122, 501 (1952)〕、ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM培地)〔Virology, 8, 396 (1959)〕、199培地〔Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 73, 1 (1950)〕、またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等を用いることができる。

培養は、通常pH6～8、30～40℃、5%CO₂存在下等の条件下で1～7日間行う。温度感受性変異株SV40tsA58のラージT抗原遺伝子を導入したトランスジェニック動物由来の細胞を増殖させるためには、温度感受性のラージT抗原変異体の活性を阻害しない温度 (30～33℃、好ましくは33℃) で培養することが好ましい。

また培養中に必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

2～3ヶ月間細胞を継代することにより、不死化した細胞を取得することができる。

上記方法により、視床下部由来細胞株、ランゲルハンス氏島由来細胞株等、内分泌細胞由来の細胞株を多数取得することができる。

視床下部、ランゲルハンス氏島等の内分泌組織には異なる多種類の細胞が存在するが、上記方法により、多種類の不死化細胞株を取得することができる。

特に、温度感受性変異株SV40tsA58のラージT抗原遺伝子を導入したトランスジェニック動物〔Exp. Anim. 48, 255 (1999)〕の内分泌細胞より、極めて効率的に、しかも再現良く多種類の不死化細胞株を多数取得することができることを、本発明において初めて見出した。

取得した細胞株の混合物は、通常の動物細胞の凍結保存法に準じて凍結保存することが可能であり、必要な時に細胞を起して各種の解析や実験に使用することができる。

上記で取得した細胞株の混合物を、コロニー形成法〔Endocrinology 136, 4084 (1995)〕等の常法に準じて、シングルクローン化することにより個々の細胞株として単離することができる。

上記方法で取得される細胞株として、下記実施例で取得された視床下部由来の798個のシングルクローン (第2表～表5-2表に示したクローンを含む)、ランゲルハンス氏島由来の261個のシングルクローン (R-1～R-45、M-1～M-63、F-1～F-9、

D-1～D-72、D2-1～D2-72)等をあげることができる。これら細胞株と同等の性質を有する細胞株は、上記本発明の方法により再現良く取得することができる。

(2) 内分泌細胞株の選択

上記(1)で取得した多種類の不死化細胞株について、内分泌細胞で発現していることが知られている各種のプロセシング酵素や修飾酵素の遺伝子の発現や、該遺伝子産物の発現を調べることにより、目的とする活性ペプチドの発現に適した内分泌細胞を選択することができる。

例えば、視床下部由来細胞株やランゲルハンス氏島細胞株由来の細胞に関しては、プロホルモンコンベルターゼ(P1/P3、PC2、furin、PC4、PACE4、PC5/PC6、PC7/SPC7/LPC/PC8)、カルボキシペプチダーゼE(CPE)、あるいはペプチジルグリシン α -アミデイティングモノオキシゲナーゼ(PAM)等の遺伝子の発現や、該遺伝子産物の発現を調べることにより目的に適した内分泌細胞株を選択できる。

また、上記の細胞株について、内分泌細胞で発現している活性ペプチド(例えば、インスリン、グルカゴン、ソマトスタチン、胰ポリペプチドなど)の発現を調べることにより、目的とする活性ペプチドの発現に適した内分泌細胞を選択することもできる。

さらに、上記の細胞株に、下記3.に記載した方法に準じて、任意の活性ペプチド前駆体遺伝子を導入し、活性型のペプチドが生産されるか調べることにより、任意の活性ペプチドの発現に適した内分泌細胞株を選択することもできる。

各種遺伝子の発現を調べる方法としては、RT-PCR法やノーザンブロット法をあげることができる。各種遺伝子産物の発現あるいは活性ペプチドの生産を調べる方法としては、各種抗体を用いた細胞染色やウエスタンブロットをあげることができる。

上記のようにして取得した内分泌細胞株は、多様な活性ペプチドを探索するためのペプチドソース、cDNAソースとしても極めて有用である。

(3) 不死化細胞株のキャラクタライゼーション

上記(1)で取得した多種の不死化細胞株、および上記(2)で選択した内分泌細胞株のキャラクタライゼーションは、該細胞株が由来する組織の細胞で発現することが知られている遺伝子や該遺伝子産物の発現を調べることにより行うことができる。

例えば、視床下部由来の細胞株においては、レプチン受容体遺伝子、プレプロオピオメラノコルチン遺伝子、CART遺伝子、プレプロアグーチ関連ペプチド遺伝子、プレプロニューロメディンU遺伝子、RFRPプレプロ蛋白質遺伝子、プレプロコルチコトロピン放出ホルモン遺伝子、プレプロメラニン凝集ホルモン遺伝子、プレプロアレキシニン遺伝子、プレプログレリン遺伝子、プレプロサイロトロピン放出ホルモン遺伝子、プレプロニューロペプチドFF遺伝子、MC4R遺伝子、NPY1R遺伝子、NPY5R遺伝子、NMU2R遺伝子、RFRP受容体遺伝子、CRHR-1遺伝子、CRHR-2遺伝子、MCHR1遺伝子、グレリン受容体遺伝子、NPFF2遺伝子等の発現を調べることで、キャラクタライゼーションを行うことができる。

ランゲルハンス氏島由来の細胞株においては、プレプロインスリン遺伝子、プレプログルカゴン遺伝子、プレプロソマトスタチン遺伝子、プレプロ胰ポリペプチド遺伝子、プロホルモンコンベルターゼ1 (PC1) 遺伝子、プロホルモンコンベルターゼ2 (PC2) 遺伝子、グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) 受容体遺伝子、PDX1 (pancreatic-duodenal homeobox 1) 遺伝子、Pax4遺伝子、Pax6遺伝子、ニューロジェニン3遺伝子、ニューロD遺伝子、Nkx2.2遺伝子、Nkx6.1遺伝子、グルコキナーゼ遺伝子、2型グルコーストランスポーター遺伝子等の発現を調べることで、キャラクタライゼーションを行うことができる [Adv. Pharmacol., 47, 255 (2000)]。

各種遺伝子の発現および各種遺伝子産物の発現は下記2.の方法に準じて行うことができる。

また、上記細胞株のキャラクタライゼーションは、該細胞株が由来する組織の細胞で発現することが知られている受容体に対するリガンド、アゴニスト、あるいはアンタゴニストへの反応性を調べることでより行うこともできる。具体例を以下に示す。

〔レプチン受容体〕

細胞をレプチンで刺激後、抗STAT抗体 (NEB社製) または抗リン酸化STAT抗体を用いた細胞染色またはウエスタンブロットを行うことにより、あるいは、c-fos遺伝子やSOCS-3遺伝子の発現変動を調べることでより、機能的なレプチン受容体 (Ob-Rb) が細胞に発現しているか調べることができる。また、STATレポーターを利用してレポーター遺伝子の発現変動を調べることでより、該レプチン受容体が機

能を有しているか確認できる。

〔ciliary neurotrophic factor (CNTF) 受容体〕

細胞をCNTFで刺激後、抗STAT抗体または抗リン酸化STAT抗体を用いた細胞染色やウエスタンブロットを行うことにより、機能的なCNTF受容体が細胞に発現しているか調べることができる。

〔 $G\alpha_q$ 蛋白質、 $G\alpha_{11}$ 蛋白質、 $G\alpha_{15}$ 蛋白質、または $G\alpha_{16}$ 蛋白質に共役するGPCR〕

細胞をリガンドやアゴニストで刺激後、細胞内 Ca^{2+} 量が増加するか調べることで、機能的な受容体が細胞に発現しているか調べることができる。

Ca^{2+} 量の増加あるいはプロテインキナーゼCの活性化で発現が増加するレポーター遺伝子をあらかじめ細胞に導入しておくことにより、レポーター遺伝子の発現を調べることで、機能的な受容体が細胞に発現しているか調べることができる。

このような受容体として、視床下部由来の細胞株においては、1型NMU受容体 (NMU1R)、2型NMU受容体 (NMU2R)、グレリン受容体、1型オレキシン受容体 (OX1R)、2型オレキシン受容体 (OX2R)、1型アンジオテンシンII受容体等を、ランゲルハンス氏島由来の細胞株においては、P2Y₁受容体等あげることができる。

〔 $G\alpha_s$ 蛋白質に共役するGPCR〕

細胞をリガンドやアゴニストで刺激後、細胞内cAMP量が増加するか調べることで、機能的な受容体が細胞に発現しているか調べることができる。

cAMP量の増加で発現が増加するレポーター遺伝子をあらかじめ細胞に導入しておくことにより、細胞内cAMP量の増加をレポーター遺伝子の発現で調べることもできる。

このような受容体として、視床下部由来の細胞株においては、4型メラノコルチン受容体 (MC4R)、1型CRH受容体 (CRHR-1)、2型CRH受容体 (CRHR-2)、ガラニン受容体、GLP-1受容体、GLP-2受容体等を、ランゲルハンス氏島由来の細胞株においては、GLP-1受容体等をあげることができる。

〔 $G\alpha_i$ 蛋白質に共役するGPCR〕

細胞をフォスコリン単独で刺激した場合と、フォスコリンおよびリガンド (またはアゴニスト) で刺激した場合の細胞内のcAMP量を比較し、後者において細胞内cAMP量の増加が減少することを調べることで、機能的な受容体が細胞

に発現していることを調べることができる。

cAMP量の増加で発現が増加するレポーター遺伝子をあらかじめ細胞に導入しておくことにより、細胞内cAMP量の増加をレポーター遺伝子の発現で調べることもできる。

このような受容体としては、視床下部由来の細胞株においては、1型NPY受容体 (NPY1R)、5型NPY受容体 (NPY5R)、RFRP受容体、2型NPFF受容体 (NPFF2R) 等を、ランゲルハンス氏島由来の細胞株においては、5種 (1~5型) のソマトスタチン受容体等あげることができる。

〔スルホニルウレア受容体〕

細胞をスルホニルウレアで刺激後、細胞内 Ca^{2+} 量が増加するか調べることにより、機能的な受容体が細胞に発現しているか調べることができる。

Ca^{2+} 量の増加で発現が増加するレポーター遺伝子をあらかじめ細胞に導入しておくことにより、細胞内 Ca^{2+} 量の増加をレポーター遺伝子の発現で調べることもできる。

〔インスリン受容体〕

細胞をインスリンで刺激後、インスリン受容体のリン酸化、insulin receptor substrate 1 (IRS-1)あるいはIRS-2のリン酸化を調べることにより、機能的なインスリン受容体が細胞に発現しているかどうかを調べることができる。

〔グルコーストランスポーター〕

細胞を高濃度 (15~30mmol/L) のグルコースで刺激後、細胞内の Ca^{2+} 濃度が上昇するか調べることにより、機能的なグルコーストランスポーターが細胞に発現しているか調べることができる。細胞の膜電位を測定することによっても調べることができる。

ランゲルハンス氏島には、 β 細胞のように、高濃度 (15~30mmol/L) のグルコースに反応して細胞が活性化 (例えば細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇) し、インスリンの合成や分泌が促進される細胞が存在する。従って、ランゲルハンス氏島由来の細胞株については、グルコース反応性を調べることによっても、各細胞株のキャラクタライゼーションを行うことができる。

また、 α 細胞のマーカーとして利用できるグルカゴン、 β 細胞のマーカーとして利用できるインスリン、 δ 細胞のマーカーとして利用できるソマトスタチン、

γ細胞のマーカーとして利用できる膵ポリペプチド、多能性幹細胞のマーカーとして利用できるネスチン〔Diabetes, 50, 521 (2001)〕の発現を調べることにより、キャラクタライゼーションを行うこともできる。

(4) 不死化細胞株の分化形質の制御

上記1. (1) で取得した不死化細胞株を異なる条件下で培養することにより、該細胞株の分化形質を制御することができる。また、分化形質を変化させた細胞株に関して、上記 (2) または (3) に示した方法を用いて、内分泌細胞株の選択または不死化細胞株のキャラクタライゼーションを行うことができる。

分化形質を制御するための培養方法として、例えば、以下 (a) ~ (h) に記載する培養方法およびこれらの方法を組み合わせた培養方法をあげることができる。

(a) 上記不死化細胞株の取得の際に使用した癌遺伝子の発現や癌遺伝子産物の活性を阻害しない条件で培養する。

例えば、SV40ラージT抗原の温度感受性変異体を発現する不死化細胞株においては、該変異体の活性を阻害しない温度 (30~33°C、好ましくは33°C) で培養することにより、分化形質を制御し、該細胞株を増殖させることができる。

分化形質を誘導したいときには、該癌遺伝子の発現や癌遺伝子産物の活性を阻害する条件で培養すればよい。即ち、SV40ラージT抗原の温度感受性変異体を発現する不死化細胞株では、37~39°C、好ましくは37°Cで培養すればよい。

(b) 無血清培地、2%以下の血清を含む培地、または無血清培地に低濃度 (1%) のN-2サプリメント (GIBCO社製) を添加した培地で培養する。

下記6.の活性測定法において、血清が存在するとバックグラウンドのレポーター活性が上昇する場合があるため、このように無血清または低血清の培地を用いた培養法は、活性ペプチドの活性測定が必要な場合には好ましい培養法である。

(c) 上記不死化細胞株で発現している受容体、トランスポーターまたはチャネルのリガンド、アゴニストまたはアンタゴニスト、あるいは該トランスポーターまたはチャネルの基質を添加して培養する。

受容体として、例えば、視床下部由来の宿主細胞株においては、GPCR (GLP-1受容体等)、核内受容体、増殖因子受容体、またはレプチン受容体等を、ランゲルハンス氏島由来細胞株においては、GPCR (GLP-1受容体等)、核内受容体、増殖因子受容体 (インスリン受容体等)、サイトカイン受容体 (アクチビンA受容体等)、

スルホニルウレア受容体等をあげることができる。

トランスポーターとしてはグルコーストランスポーターをあげることができる。
チャネルとしてはCaチャネル、Kチャネル、Clチャネル、Naチャネル等をあげることができる。

例えば、5～30mmol/Lのグルコースを添加して培養することにより、細胞の分化形質や遺伝子の発現を制御して培養することができる。

(d) 上記不死化細胞株で発現している受容体のシグナルを代替することのできる物質を添加して培養する。

受容体のシグナルを代替することのできる物質として、例えば、プロテインキナーゼA、プロテインキナーゼB、プロテインキナーゼC、MAPキナーゼ等のプロテインキナーゼ、低分子量G蛋白質を活性化または抑制する物質、G蛋白質共役型受容体のシグナルを代替することのできるフォルスコリン、8-プロモ-サイクリックAMP (8-Br-cAMP)、3-イソブチル-1-メチルキサンチン (3-isobutyl-1-methylxanthine)、ホルボール12-ミリステート13-アセテート (PMA)、およびイオノマイシン等をあげることができる。

(e) 神経細胞やグリア細胞の分化を制御する培養法で培養する。

該培養法として、ラミニンをコートしたディッシュ上で培養する方法、スクシニル化コンカナバリンA (succinylated concanavalin A) を添加して培養する方法 [J. Neurobiol., 39, 1, (1999)] 等をあげることができ、視床下部由来の細胞株の培養に適している。

(f) ランゲルハンス氏島細胞の分化を制御する培養法で培養する。

該培養法として、ゼラチンをコートしたディッシュ上で培養する方法 [Diabetes, 48, 1402 (1999)]、アクチビン、GLP-1、フォリスタチン、グルコース、肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor)、上皮増殖因子 (epidermal growth factor)、ニコチンアミド、ペータセルリン、副甲状腺ホルモン関連ペプチド (parathyroid hormone-related protein)、甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン (thyrotropin-releasing hormone)、血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor)、islet neogenesis-associated protein、血小板由来増殖因子 (platelet-derived growth factor)、インシュリン様増殖因子I (insulin-like growth factor I)、繊維芽細胞増殖因子 (fibroblast growth

factor)、神経成長因子 (nerve growth factor)、あるいはReg蛋白質を添加して培養する方法〔最新医学, 54, 2522 (1999); Nat. Med. 6, 278 (2000); Eur. J. Biochem., 267, 971 (2000); J. Biol. Chem. 274, 6360 (1999); Int. J. Mol. Med., 3, 247 (1999)〕等をあげることができ、ランゲルハンス氏島由来の細胞株の培養に適している。

(g) 上記不死化細胞株で発現している受容体のリガンドやアンタゴニストを発現している細胞と共培養する。

(h) 上記不死化細胞株で発現している受容体の細胞内シグナル伝達に関与しているシグナル伝達分子または転写因子の遺伝子、あるいは、該不死化細胞株の分化や機能発現に重要な転写因子の遺伝子を導入、発現させて培養する。

転写因子遺伝子として、例えば、視床下部細胞由来の細胞株においては、Gsh-1遺伝子を、ランゲルハンス氏島由来の細胞株においては、PDX1遺伝子、Pax4遺伝子、Pax6遺伝子、ニューロジェニン3遺伝子、ニューロD遺伝子、Nkx2.2遺伝子、Nkx6.1遺伝子、Isl-1遺伝子、upstream stimulatory factor遺伝子等をあげることができる〔Adv. Pharmacol., 47, 255 (2000); Biochem. J., 341, 315 (1999)〕。また、上記の受容体、シグナル伝達分子、または転写因子の構成活性型変異体やドミナントネガティブ変異体の遺伝子を導入、発現させてもよい。遺伝子導入は下記3.の方法に準じて行うことができる。

2. 活性ペプチド前駆体遺伝子の取得

活性ペプチド前駆体遺伝子としては、活性ペプチド前駆体をコードするDNAであればいかなるものも用いることができる。活性ペプチド前駆体をコードするDNAは以下のようにして取得できる。活性ペプチド前駆体のcDNAの塩基配列を元にして、該活性ペプチド前駆体をコードする領域を含む該cDNAの領域を適当に選択する。選択した領域の塩基配列の5'端20～40塩基の配列を3'端に含むDNA、選択した領域の塩基配列の3'端20～40塩基と相補的な配列を3'端に含むDNAをそれぞれDNA合成機で合成する。該活性ペプチドが発現している組織や細胞からcDNAを調製する。調製したcDNAを鋳型とし、2種類の合成DNAをプライマーとして用いたPCRにより該活性ペプチド前駆体をコードするDNAを増幅し単離することができる。組織や細胞からのcDNAの調製、およびPCRはMolecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001) (以下、モレキュラー・クロ

ーニング第3版と称する)に記載の方法に従って行うことができる。

また、該活性ペプチド前駆体遺伝子内の活性ペプチドをコードする領域を任意のペプチドをコードするDNAで置き換えることにより、以下の3.および5.に記載の方法を用いて、任意のペプチドを発現し生産することができる。また、上記の方法で任意のペプチドをコードするDNAとして、ランダムな配列を有する複数のDNAの混合物を用いることにより、ランダムペプチドライブラリーを作製することもできる。

3. 活性ペプチド前駆体遺伝子の発現ベクターの造成と宿主への導入

遺伝子発現用の宿主細胞として上記1.で選択した内分泌細胞株を使用し、活性ペプチド前駆体遺伝子を適切な発現ベクターのプロモーター下に挿入した組換え体ベクターを造成し、該ベクターを該宿主細胞に導入することにより、活性ペプチド前駆体遺伝子の発現系を構築することができる。

(1) プラスミドベクターを用いた遺伝子の導入

活性ペプチド前駆体遺伝子を発現するためのプラスミドベクターに必要な構成要素として、発現させる外来遺伝子用の発現ユニット（プロモーターの下流に目的の活性ペプチド前駆体をコードするDNAを挿入できる制限酵素サイトとポリA付加シグナルを順に連結した構造）を有するプラスミドがあげられる。

プロモーターとしては、動物細胞中で機能するものであればいずれも用いることができ、例えば、ヒトサイトメガロウイルス (CMV) のIE (immediate early) 遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーター、モロニーマウス白血病ウイルスのロング・ターミナル・リピート (LTR) プロモーター、ラウス肉腫ウイルスのLTRプロモーター、単純ヘルペスウイルス (HSV) のチミジンキナーゼ (TK) 遺伝子のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、ヒートショックプロモーター、SR α プロモーター、メタロチオネインのプロモーター等をあげることができる。また、6. (2) に後述する特定の転写因子に応答する配列を有するプロモーターも用いることができる。上記プロモーターと共に、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサー等も用いることができる。また、プロモーターとしては、動物細胞中で、特定の転写因子に反応し機能するプロモーターも用いることができる。

この場合、該転写因子を発現することのできる動物細胞あるいは、該転写因子を発現することのできるように該転写因子の発現プラスミドを導入した動物細胞を

利用する必要がある。

このようなプロモーターとして、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 由来の転写因子Gal4pに応答するプロモーター等をあげることができる。

Gal4pに応答するプロモーターは、Gal4pのみならず、Gal4pのDNA結合領域と任意の転写因子の転写活性化領域のキメラ蛋白質にも反応する。

転写因子の転写活性化領域としては、helpes simplex virusのVP16の転写活性化領域 (transactivation domain) [Nature, 335, 563 (1988)]、エストロジェン受容体のリガンド結合領域 [Cell, 54, 199 (1988); Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 90, 1657 (1993)] をあげることができる。エストロジェン受容体のリガンド結合領域を利用する場合、エストロジェンを細胞に添加することにより転写を開始させることができる。

ポリA付加シグナルとしては、いかなるポリA付加シグナルも利用できるが、例えば、SV40初期遺伝子のポリA付加シグナル、ウサギβグロビン遺伝子のポリA付加シグナル、ウシ成長ホルモンのポリA付加シグナル等を用いることができる。

宿主に導入した発現プラスミドのコピー数を増加させるため、あるいは宿主に導入した発現プラスミドをプラスミド状態で維持させるためには、動物細胞での複製に必要な複製開始点を有するプラスミドベクターを使用する。複製開始点としては、SV40の複製開始点やエプスタイン・バー・ウイルスの複製開始点oriPを用いることができる。SV40の複製開始点を有するプラスミドベクターは、SV40のラージT抗原を発現する宿主中ではコピー数が増加するため、目的の遺伝子を高発現させる上で好適である。上記1.で取得したSV40の温度感受性ラージT抗原を発現する不死化細胞株に関しては、該ラージT抗原が機能する条件下で培養された細胞株中においては、SV40の複製開始点を有するプラスミドベクターを用いることで、目的の遺伝子を高発現することができる。oriPを含むベクターは、エプスタイン・バー・ウイルスのEBNA-1 (Epstein-Barr virus nuclear antigen-1) を発現する宿主中では宿主の染色体に組み込まれず、染色体外に維持される。

oriPを含むベクターが染色体外に安定に維持されるかどうかは宿主に依存している。EBNA-1を発現するB細胞株を宿主とした場合、該ベクターは一般に染色体外に安定に維持される。もともとEBNA-1を発現しない細胞でも、外来的にEBNA-1遺伝子を導入して発現させることにより、oriPを含むベクターがプラスミド状態で

維持されるようになる場合があることが知られている。

さらにプラスミドベクターには、大腸菌 [*Escherichia coli* (*E. coli*)] 用の内在性プロモーターを含む薬剤耐性遺伝子、大腸菌中での複製に必要な複製開始点、大腸菌を用いたベクターの調製のために必要である。大腸菌用の薬剤耐性遺伝子としては、大腸菌由来のアンピシリン耐性遺伝子 (β -ラクタマーゼ遺伝子)、テトラサイクリン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子等があげられる。大腸菌での複製に必要な複製開始点としては、pBR322の複製開始点、colE1の複製開始点等があげられる。

一過性の発現でなく安定した形質転換株の取得のためには、さらに動物細胞用の薬剤耐性遺伝子の発現ユニット（プロモーターの下流に薬剤耐性遺伝子とポリA付加シグナルを順に連結した構造）を有するプラスミドが望ましい。動物細胞用の薬剤耐性遺伝子としては、ネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子、ブラストサイジン耐性遺伝子、ピューロマイシン耐性遺伝子、ゼオシン耐性遺伝子等があげられる。プロモーターとポリA付加シグナルは活性ペプチド前駆体遺伝子を挿入する発現ユニットに用いられるものと同様のものを用いることができる。

発現用のプラスミドベクターとしては、pcDNA1/Amp、pcDNA3.1(+)、pcDNA3.1(-)、pcDNA3.1(+)-Hygro、pcDNA3.1(-)-Hygro〔以上全てインビトロジェン (Invitrogen) 社製〕、pCDM8、pREP4、pAGE107、pAGE103、pAMo [J. Biol. Chem., 268, 22782 (1993)、別名pAMoPRC3Sc (特開平05-336963)]、pAMoA、pAS3-3、pAMoh (実施例19)、pGal9-nd (下記実施例18参照)、pGal9-d (下記実施例18参照) 等をあげることができる。

活性ペプチド前駆体をコードするDNAを外来遺伝子用の発現ユニットのプロモーターの下流に挿入し、組換えベクターを造成する。

組換えベクターの導入方法としては、動物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075)、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)]、Virology, 52, 456 (1973) に記載の方法等をあげることができる。

また、市販のDNA導入試薬を用いることもできる。該DNA導入試薬として、

Lipofectamine plus (GIBCO-BRL社製)、LipofectAMINE 2000 (GIBCO-BRL社製)、LipofectAMINE (GIBCO-BRL社製)、Lipofectin (GIBCO-BRL社製)、DMRIE-C (GIBCO-BRL社製)、Superfect (QIAGEN社製)、Effectene (QIAGEN社製)、TransFast (Promega社製)、GeneJammer (Stratagene社製)、FuGENE (Roche社製)、DuoFect (Q-biogene社製)、Transfectam (BioSEPRAS社製)等をあげることができる。

上記方法による遺伝子導入において、宿主として使用する内分泌細胞株ごとに、できるだけ発現量の高い発現ベクターを使用することが好ましい。従って、使用する宿主ごとに、最適な発現ベクター、プロモーター、および遺伝子の導入法の最適化を試みるのが好ましい。

6.に後述するレポーター系を用いたアッセイ方法を利用し、生産されたペプチドの活性を高感度で検出することにより、遺伝子導入のための最適条件を決定することができる。該アッセイ系において、96穴プレートを利用し、各穴ごとに遺伝子導入条件を設定することにより、極めて効率良く遺伝子導入のための最適条件を決定することができる。

(2) ウイルスベクターを用いた遺伝子の導入

目的とする活性ペプチド前駆体遺伝子を発現するためのウイルスベクターとしてはパッケージング細胞において組換えウイルスが生産でき、宿主細胞株で目的の遺伝子を発現させるために好適なプロモーターを含有しているものを用いることができ、例えば、MFG [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 6733-6737 (1995)]、pBabePuro [Nucleic Acids Research, 18, 3587-3596 (1990)]、LL-CG、CL-CG、CS-CG、CLG [Journal of Virology, 72, 8150-8157 (1998)]、およびpAdex1 [Nucleic Acids Res., 23, 3816-3821 (1995)]等をあげることができる。これらウイルスベクターは、該ウイルスのパッケージングに必要なタンパク質をコードする遺伝子の少なくとも1つが欠損している。

パッケージングに必要なタンパク質として、レトロウイルスベクターの場合にはマウスレトロウイルス由来のgag、pol、env等、レンチウイルスベクターの場合にはHIVウイルス由来のgag、pol、env、vpr、vpu、vif、tat、rev、nef等、アデノウイルスベクターの場合にはアデノウイルス由来のE1A、E1B等、アデノ随伴ウイルスの場合はRep(p5,p19,p40)、Vp(Cap)等の蛋白質をあげることができる。

プロモーターとしては、上記(1)に記載のプロモーターを使用することができる。

活性ペプチド前駆体遺伝子をウイルスベクター内のプロモーターの下流に挿入し、組換えウイルスベクターを造成する。

造成した該組換えウイルスベクタープラスミドを、該ウイルスベクタープラスミドに適合したパッケージング細胞に導入する。

パッケージング細胞としては、該ウイルスベクターが欠損する上記遺伝子のコードするパッケージングに必要なタンパク質を補給できる細胞であればいかなるものも用いることができ、例えば、該遺伝子を発現させたヒト腎臓由来のHEK293細胞やマウス線維芽細胞NIH3T3等を用いることができる。

上記組換えウイルスベクターを上記パッケージング細胞に導入し、組換えウイルスを生産する。

上記パッケージング細胞への上記ウイルスベクターの導入法として、例えば、リン酸カルシウム法(特開平2-227075)、リポフェクション法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)〕等をあげることができる。

生産された組換えウイルスを宿主細胞に感染させることにより、宿主にウイルスベクターを導入することができる。

使用する宿主ごとに、最適な発現ベクター、プロモーター、および遺伝子の導入法の最適化を試みるのが好ましく、上記(1)と同様の方法で、遺伝子導入のための最適条件を決定することができる。

4. 活性ペプチド前駆体遺伝子の発現クローニング系

活性ペプチド前駆体遺伝子の発現クローニング系は以下のようにして構築することができる。

(1) cDNAライブラリーの作製

活性ペプチド前駆体遺伝子の発現クローニング系では、特定の活性ペプチド前駆体遺伝子のかわりに、細胞や組織から単離したcDNAを発現ベクターに挿入することによりcDNAライブラリーを作製する。

cDNAソースとして、ヒトまたは動物のいかなる組織や細胞も使用することができるが、活性ペプチドを探索するためには、活性ペプチドを発現する能力のある細胞や該細胞を含む組織を用いることが好ましい。

例えば、全脳、脳の各種部位（視床下部、視床、下垂体、小脳、海馬、線条体、黒質、尾状核、扁桃体、脳梁）、副腎、腎臓、小腸、大腸、心臓、リンパ節、脊髄、気管、脾臓、骨髓、肝臓、乳腺、子宮、肺、胎盤、胃、甲状腺、骨格筋、脾臓ランゲルハンス氏島、 α 細胞、 β 細胞、 δ 細胞、 γ 細胞などを使用することができる。また、上記1.で取得した不死化細胞株を使用することもできる。

上記の組織または細胞よりmRNAを取得し、該mRNAより2本鎖cDNAを合成し、該cDNAを3. (1) に記載の発現ベクターのプロモーターの下流に挿入して組換えベクターを作製する。該組換えベクターを大腸菌に導入してcDNAライブラリーを作製することができる。このような方法で作製されたcDNAライブラリーとしては、例えば、誘導発現ベクターpAGal9-ndを用いて作製したヒト視床下部由来のcDNAライブラリー（実施例23参照）等をあげることができる。該cDNAライブラリーを適当な濃度に希釈して寒天培地上で培養し、出現した個々のコロニーをクローン（大腸菌）として単離することができる。また、各クローン（大腸菌）からプラスミド（組換えベクター）を単離することにより、cDNAクローン（プラスミド）を取得することができる。プラスミドはモレキュラー・クローニング第3版等に記載の常法あるいはQIAprep 96 Turbo Miniprep Kit（キアゲン社製）等のキットを用いて単離できる。

(2) 活性ペプチド前駆体をコードするcDNAの探索

該cDNAライブラリーから単離したクローン（大腸菌）を1～10000クローンずつ、好ましくは10～100クローンずつのプールに分け、各プールごとに大腸菌を培養しプラスミド（cDNAクローンの混合物）を単離する。得られた各プール由来のプラスミド（組換えベクター）をそれぞれ、1.で取得した細胞を宿主細胞として、3.に記載の方法で宿主細胞へ導入する。得られた形質転換株を後述する5. (1) に記載の方法で培養し、各cDNAクローンがコードする蛋白質を発現させる。該形質転換株あるいは培養上清を試料として、後述する6.に記載の方法で活性測定を行い、活性が検出されたプールを選択する。選択したプールについて再度より細かくプール分けし、同様の操作を行う。この工程を繰り返し、最終的に1クローンごとに上記の操作を行なうことにより、目的の活性ペプチド前駆体をコードするcDNAを同定することができる。

各cDNAクローンが含むcDNAの塩基配列が明らかな場合は、活性ペプチド前駆体

をコードする可能性の高いcDNAを選択して上記の操作を行うことにより、目的の活性を有するDNAを効率的に探索することができる。活性ペプチド前駆体をコードする可能性の高いcDNAとしては、シグナル配列を有し、80～250アミノ酸からなり、シグナル配列以外の領域に塩基性アミノ酸が2つ連続した配列を有し、膜結合領域を持たないと推定されるという特徴を有するペプチドをコードするものがあげられる。各cDNAがコードし得るアミノ酸配列について、上記の特徴を解析することにより、活性ペプチド前駆体をコードする可能性の高いcDNAを選択することができる。シグナル配列や膜貫通領域は、PSORT [Trends Biochem. Sciences 24, 34 (1999)] や SignalP [SignalP web site (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)] 等のプログラムや、解析ソフトMacMolly 3.5 (アロカ社)、解析ソフトSOSUI system ver1.0/10 (三井情報開発) 等を用いてアミノ酸配列から予測することができる。

5. 活性ペプチドの生産

(1) 形質転換株を用いた活性ペプチドの生産

上記3.で取得された形質転換株を培養することにより得た培養液、細胞、または該細胞の抽出液から、目的とする活性ペプチドを取得することができる。

培養は、上記1. (1) の培養法、あるいは上記1. (4) の不死化細胞株の分化形質を制御した培養方法に準じて行うことができる。

(2) 内分泌細胞株を用いた活性ペプチドの生産

上記1.に記載した方法で樹立された多種類の内分泌細胞株を、上記1. (1) または1. (4) の方法に準じて培養することにより、各細胞株特有の活性ペプチドを生産することができる。

例えば、視床下部由来の細胞株が生産する既知の活性ペプチドとしては、NPY、 α -MSH、NPFF、CRH、TRH等を、ランゲルハンス氏島由来の細胞株が生産する既知の活性ペプチドとしては、インスリン、グルカゴン、ソマトスタチン、膵ポリペプチド、グレリン等をあげることができる。上記1.に記載した方法で樹立された多種類の内分泌細胞株からは、新規な活性ペプチドも生産されと考えられ、該細胞株は新規な活性ペプチドの探索にも極めて有用である。

(3) 分泌刺激による活性ペプチドの放出

内分泌細胞においては、活性ペプチドは分泌顆粒に蓄積され、適当な分泌刺激

が加わると一気に細胞外へ放出されることが知られている。従って、本発明の内分泌細胞由来の細胞株を用いた活性ペプチドの生産においても、該細胞に適当な分泌刺激を施すことが好ましい場合がある。

分泌刺激剤としては、高カリウム（例えば50～100mmol/L）、高グルコース（例えば25mmol/L）、Tolbutamide（例えば100 μ mol/L）、ATP（例えば1 μ mol/L～10mmol/L）等をあげることができる。

また、分泌刺激剤として使用できる物質を、以下のようにして選択することもできる。

内分泌細胞由来の細胞株に被検物質を添加し、細胞内のCa²⁺濃度を増加させる活性を有する被検物質を選択する。Ca²⁺濃度の測定は、公知の方法にしたがって、CAF-110器機（日本分光社製）、FLIPR（Molecular Devices社製）、FDSS6000システム（浜松ホトニクス社製）等の機器を用いて測定することができる。

内分泌細胞株に任意の活性ペプチド前駆体遺伝子（例えば、バソプレッシン前駆体遺伝子またはCRH前駆体遺伝子）を導入し、2～4日培養後、該被検物質を添加し、培地中の活性ペプチド（例えば、バソプレッシンまたはCRH）の量を測定する。該被検物質を添加しない場合と比較し、添加することにより活性ペプチドの量が増加する物質を分泌刺激剤として選択する。

最終的に使用する分泌刺激剤としては、活性の検出に影響のないものを選択することが重要である。下記6.のレポーター系を用いるアッセイ細胞の場合には、該アッセイ細胞に作用してレポーター活性を上昇させない刺激剤を選択する必要がある。

できるだけ少量の培地を用い、適当な分泌刺激剤を添加してペプチドを一気に放出させることにより、高濃度のペプチド溶液を取得することができる。このような高濃度ペプチド溶液は、上記アッセイ系において、効率よく活性を検出するため好ましい。

また、下記6.のアッセイ細胞を重層してアッセイする場合は、少量の培地を用いなくとも、適当な分泌刺激剤を添加することによりアッセイ細胞周辺のペプチド濃度を高めることができるため、分泌刺激剤を使用しない場合と比較し、より効率よく活性を検出できる。

生産される活性ペプチドの分泌顆粒への蓄積は培養条件により制御することが

可能な場合がある。

例えば、マウス由来の β 細胞株であるMIN6のインスリン生産において、高グルコース (25mmol/Lグルコース) 含有培地で培養すると、インスリンは高生産されるものの恒常的に培地中に分泌されるが、低グルコース (5.5mmol/Lグルコース) 含有培地で培養した場合には、生産量は低いもののインスリンは分泌顆粒に蓄積される。

従って、活性ペプチド前駆体遺伝子を発現させたMIN6を高グルコース含有培地〔例えばDMEM (HG) 培地: 25mmol/Lグルコース、15%牛胎児血清、25U/mlペニシリン、および25 μ g/mlストレプトマイシンを含むDMEM培地 (日水製薬製)〕で培養した後、低グルコース含有培地〔例えばDMEM (LG) 培地: 5.5mmol/Lグルコース、15%牛胎児血清、25U/mlペニシリン、および25 μ g/mlストレプトマイシンを含むDMEM (日水製薬製) 培地〕で培養することにより生産された活性ペプチドを分泌顆粒に蓄積させ、その後適当な分泌刺激を行うことにより、一気に多量の活性ペプチドを放出させることができる。

(4) 活性ペプチドの修飾

1. で取得した内分泌細胞株、特に1. (2) に記載の各種のプロセシング酵素や修飾酵素の遺伝子を発現している内分泌細胞株を用いて5. (1) または (2) に記載の方法でペプチドを生産させることにより、ペプチドの活性に必要な適切な修飾を受けることができる。このようなペプチドの修飾としてはC末端のアミノ酸のアミド化、N末端へのピログルタミン酸の付加、脂肪酸の付加、糖鎖の付加等をあげることができる。

6. ペプチドの活性測定

活性ペプチド前駆体遺伝子を内分泌細胞に導入して発現させた後、該細胞の培養上清、該細胞の細胞抽出液、該細胞の膜画分、または該細胞自身を用いて、ペプチドの活性を測定することができる。活性の測定法としては、活性を測定できるいかなる方法も使用することができるが、できるだけ感度の高い方法を用いることが望ましい。例えば、該活性ペプチドと結合する抗体を用いたサンドイッチELISA法、該活性ペプチド特異的なバイオアッセイ法等をあげることができる。

例えば、活性ペプチドがGPCRのような受容体のリガンドである場合は、受容体を利用したアッセイ系により、活性ペプチドを高感度、高シグナル/ノイズ比で、

簡便に検出することができる。

以下、受容体を利用したアッセイ系で、レポーター遺伝子を用いた具体例を示す。アッセイに用いる細胞（以下アッセイ細胞ともいう）は、GPCR等の受容体からのシグナルに応答するプロモーターの下流に連結されたレポーター遺伝子を有し、活性ペプチドの受容体遺伝子の発現ユニットを有する細胞である。活性ペプチドとアッセイ細胞上の受容体が結合すると、受容体からシグナルが流れ、レポーター遺伝子の発現が誘導される。したがって、アッセイ細胞に試料を接触させ、レポーター遺伝子の発現量を測定することにより、試料中の活性ペプチドを検出することができる。活性ペプチドの受容体が細胞内 Ca^{2+} 上昇を引き起こすタイプのGPCRである場合は、アッセイ細胞に試料を接触させ、細胞内 Ca^{2+} 上昇を測定することによっても、試料中の活性ペプチドを検出することができる。アッセイ細胞は以下の方法で構築することができる。

(1) 活性ペプチドの受容体をコードするDNAを発現させるための宿主・ベクター系の構築

活性ペプチドの受容体をコードするDNAを発現させるための宿主・ベクター系は、モレキュラー・クローニング第3版等に記載の通常の方法により構築することができる。本発明において構築されたエプスタイン・バー・ウイルスのEBNA-1遺伝子が発現する無血清馴化したB細胞株を宿主として、エプスタイン・バー・ウイルスの複製開始点oriPを有するプラスミドをベクターとする系は、ベクターが宿主細胞の染色体外にプラスミド状態で安定に存在し、アッセイ細胞の構築上望ましい以下の (i) ~ (iii) に示す性質をもつ。

(i) ベクターの宿主細胞への導入効率が高い。(ii) 宿主細胞および得られるアッセイ細胞が非接着性細胞（浮遊系細胞）のため、培養操作が簡便で、アッセイの簡便性と汎用性が高い。ペプチドの発現を調べたい細胞が接着性細胞の場合、該細胞の上にアッセイ細胞を重ねてアッセイすることが簡便にできるため、アッセイ方法によっては、アッセイ系の検出感度を上げることができる。(iii) 宿主細胞および得られるアッセイ細胞を無血清で培養することができる。種々の成分を含むためアッセイ系のバックグラウンドを上昇させる場合がある血清をアッセイ系に用いる必要がないので、アッセイ系の検出感度、シグナル／ノイズ比、汎用性、および簡便性が高い。以下、本発明において構築された系について示す。

(a) エプスタイン・バー・ウイルスのEBNA-1遺伝子を発現する無血清馴化したB細胞株の取得

エプスタイン・バー・ウイルスのEBNA-1遺伝子を発現するB細胞株としては、エプスタイン・バー・ウイルスのEBNA-1遺伝子を発現するB細胞株であればいかなるB細胞株でも用いることができるが、安全面からは、エプスタイン・バー・ウイルスを産生しない細胞株を使用するのが好ましい。該細胞としては、例えば、Namalwa細胞(ATCC番号:CRL-1432)、Raji細胞(ATCC番号:CCL-86)、Daudi細胞(ATCC番号:CCL-213)を使用することができる。より好適には、Namalwa細胞を使用することができる。公知の方法〔Cytotechnology, 1, 151 (1988); Dev. Biol. Stand., 99, 153 (1999); Pharmacol. Ther., 53, 355 (1992); Cytotechnology, 5, 3 (1991); Adv. Biochem. Eng. Biotechnol., 34, 95 (1987); 特許1653986号〕に従って、上記細胞株を無血清馴化することにより、エプスタイン・バー・ウイルスのEBNA-1遺伝子を発現する無血清馴化したB細胞株を取得することができる。エプスタイン・バー・ウイルスのEBNA-1遺伝子を発現し、無血清馴化したB細胞株としては、好ましくは無血清馴化したNamalwa細胞、より好ましくはNamalwa細胞を無血清馴化することによって取得したNamalwa KJM-1細胞〔Cytotechnology, 1, 151 (1988)〕が用いられる。

エプスタイン・バー・ウイルスのEBNA-1遺伝子を発現する無血清馴化したB細胞株を培養する培地は、一般に使用されているRPMI1640培地〔J. Am. Med. Assoc., 199, 519 (1967)〕、EagleのMEM培地〔Science, 122, 501 (1952)〕、DMEM培地〔Virology, 8, 396 (1959)〕、199培地〔Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 73, 1 (1950)〕、またはこれら培地に無血清培養用の添加物を添加した培地〔Cytotechnology, 1, 151 (1988); Dev. Biol. Stand., 99, 153 (1999); Pharmacol. Ther., 53, 355 (1992); Cytotechnology, 5, 3 (1991); Adv. Biochem. Eng. Biotechnol., 34, 95 (1987)〕等が用いられる。また、市販の無血清培養用の培地を用いることもできる。

培養は、通常pH6~8、30~40℃、5%CO₂存在下等の条件下で1~7日間行う。また培養中に必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。また、以降に記載するように該細胞に薬剤耐性遺伝子を含むプラスミドを導入した場合は、対応する薬剤を培地に添加して培養してもよい。

(b) ベクターの構築

活性ペプチドの受容体をコードするDNAを挿入する発現用ベクターとしては、宿主動物細胞で該DNAを発現できるベクターで、動物細胞中での複製に必要な複製開始点として、エプスタイン・バー・ウイルスのoriPを有するものをあげることができる。このような発現用ベクターとして、pAMo、pAMoA、pAMoh等、あるいは上記3. (1) の発現ベクターに該oriPを導入したもの等をあげることができる。

発現用ベクター中の外来遺伝子用の発現ユニットのプロモーターの下流に活性ペプチドの受容体をコードするDNAを挿入し、該受容体発現プラスミドを造成する。該受容体をコードするDNAは、以下のようにして取得できる。該受容体をコードするcDNAの塩基配列を元にして、該受容体をコードする領域を含む該cDNAの領域を適当に選択する。選択した領域の塩基配列の5' 端20～40塩基の配列を3' 端に含むDNA、選択した領域の塩基配列の3' 端20～40塩基と相補的な配列を3' 端に含むDNAをそれぞれDNA合成機で合成する。該受容体が発現している組織や細胞からcDNAを調製する。調製したcDNAを鋳型とし、2種類の合成DNAをプライマーとして用いたPCRにより該受容体をコードするDNAを増幅し単離することができる。組織や細胞からのcDNAの調製、およびPCRはモレキュラー・クローニング第3版に記載の方法に従って行うことができる。

(c) 宿主への発現プラスミドの導入と形質転換株の取得

発現プラスミドを、上記3. (1) に記載の方法により6. (1) (a) で取得した宿主細胞に導入する。形質転換体の取得および培養は、特開平2-227075号公報あるいは特開平2-257891号公報に記載されている公知の方法に準じて行なうことができる。

(2) 活性ペプチドの受容体をコードするDNAを誘導発現させる宿主・ベクター系の構築

上記6. (1) で取得したエプスタイン・バー・ウイルスのEBNA-1遺伝子を発現する無血清馴化したB細胞株を宿主、エプスタイン・バー・ウイルスのoriPを有するプラスミドをベクターとする宿主・ベクター系に、活性ペプチドの受容体をコードするDNAの誘導発現系を組み込むことにより、該DNAの効率的な誘導発現が可能な宿主・ベクター系を構築することができる。外来の活性ペプチドの受容体をコードするDNAを発現させた細胞はしばしば生育が悪くなるが、アッセイに用いるま

で該DNAの発現を抑えておくことにより、アッセイ細胞を良好に生育させることができる。また、受容体がGPCRの場合、下記 [II] の (2) に記載するように、誘導発現系を用いてGPCRを一過的に高発現させることにより、GPCRの構成的活性を検出することができるようになる。

誘導発現系は、特定の薬剤の添加等により活性化される転写因子を発現させた宿主に、該活性化された転写因子に応答するプロモーターの下流に任意のDNAを連結した構造を有する誘導発現ベクターを導入し、薬剤の添加等により該DNAを誘導発現させる系である。誘導発現系としては、例えばエストロジェンを用いる系 [Cell, 54, 199 (1988); Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 90, 1657 (1993)]、テトラサイクリン耐性オペロンを用いる系 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 5547 (1992); Methods Enzymol. 283, 159 (1997)]、昆虫ホルモンエクジソンを用いる系 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 93, 3346 (1996)]、ラクトースオペロンを用いる系 [Cell, 48, 555 (1987)] 等を用いることができる。

エストロジェンを用いる系 [Cell, 54, 199 (1988); Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 90, 1657 (1993)] では、宿主に発現させる転写因子として酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 由来の転写因子Gal4pのDNA結合領域とエストロジェン受容体のリガンド結合領域のキメラ蛋白質 (Gal4-ER) を用い、発現ベクターのプロモーターとして、Gal4p応答性プロモーターを用いる。本系では、エストロジェンの添加により、該プロモーター下にある任意の遺伝子の発現を誘導することができる。また、使用するエストロジェンの濃度を変えることにより、遺伝子の発現量を制御することができる。

また、テトラサイクリン耐性オペロンを用いる系 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 5547 (1992); Science, 268, 1766 (1995); Methods Enzymol. 283, 159 (1997)] では、宿主に発現させる転写因子として、テトラサイクリン-コントロールド・トランスアクチベーター [大腸菌のテトラサイクリン・レプレッサーとHSVのVP16の転写活性化領域のキメラ蛋白質] またはリバース・テトラサイクリン・コントロールド・トランスアクチベーター (テトラサイクリンとの結合時に転写を活性化するような変異型のテトラサイクリン・レプレッサーとHSVのVP16の転写活性化領域のキメラ蛋白質) を用い、発現ベクターのプロモーターとして、テトラサイクリン応答配列を有するプロモーターを用いる。本系では、テトラサ

イクリン・コントロールド・トランスアクチベーターを用いた場合はテトラサイクリンまたはドキシサイクリン (doxycycline) の除去により、リバース・テトラサイクリン・コントロールド・トランスアクチベーターを用いた場合は該薬剤の添加により、上記プロモーター下にある任意のDNAの発現を誘導することができる。また、存在する該薬剤の濃度を変えることにより、遺伝子の発現量を制御することができる。

大腸菌のラクトースオペロンを用いる系では、宿主に発現させる転写因子として、大腸菌のラクトース・レプレッサーを用い、ベクターのプロモーターとして、ラクトースオペレーターを有するプロモーターを用いる。本系では、イソプロピル- β -D-チオガラクトシドの添加により、該プロモーター下にある任意のDNAの発現を誘導することができる。

昆虫のホルモンを用いる系では、宿主に発現させる転写因子として、ショウジョウバエ由来のエクジソン受容体とレチノイン酸受容体RXRのヘテロダイマーを用い、ベクターのプロモーターとして、エクジソン応答配列を有するプロモーターを用いる。本系では、ムリステロンA (Muristerone A) またはボナスステロンA (ponasterone A) の添加により、該プロモーター下にある任意のDNAの発現を誘導することができる。

誘導発現ベクターは、例えば以下の方法で構築することができる。

6. (1) (b) 記載の発現用プラスミドベクターに、宿主に発現させる転写因子に対応する応答配列を有する上記プロモーターを導入する。

該プロモーターは、例えば3. (1) に記載した外来遺伝子の発現用プロモーターに1つ以上の応答配列を含むDNAを挿入することにより構築することもできる。例えば、5つのGal4p応答配列を有するGal4p応答性プロモーター（転写因子Gal4-ERに対応）（実施例18のpAGalSd1等）、テトラサイクリン応答配列の下流にCMVプロモーターを連結したテトラサイクリン応答配列を有するプロモーター（クロンテック社製のpTRE2等）、RSVのLTRプロモーターの下流にラクトースオペレーターを連結したラクトースオペレーターを有するプロモーター（ストラタジーン社製のpORSVI/MCS等）、5つのエクジソン応答配列の下流にヒートショックプロモーターを連結したエクジソン応答配列を有するプロモーター（ストラタジーン社製のpEGSH、インビトロジェン社製のpIND等）をあげることができる。

該プロモーター中の応答配列およびTATA配列に関して、それぞれの配列、数、位置を検討することによって、感度やシグナル／ノイズ比の最適化を行うことができる。6. (3) に後述するように、検討するプロモーターの下流にレポーター遺伝子を挿入したレポーター誘導発現プラスミドを造成し、それぞれのレポーター誘導発現プラスミドを宿主細胞に導入して形質転換株を取得し、該形質転換株でレポーターを誘導発現させ、非誘導時のレポーターの発現量が低く、非誘導時に対する誘導時のレポーター発現量の倍率が高いプロモーターを選ぶことにより、プロモーターの最適化を行うことができる。

このようなプロモーターの最適化を行なった誘導発現用ベクターとして、pGal9-d、pGal9-nd (いずれも実施例18) 等をあげることができる。

上記誘導発現用のプロモーターの下流に活性ペプチドの受容体をコードするDNAを挿入し、活性ペプチドの受容体をコードするDNAを誘導発現することのできるプラスミドを造成することができる。

該DNAの誘導発現を行なうための転写因子を発現する宿主は、以下のように構築することができる。

発現プラスミド構築のためのベクターとしては、動物細胞で該転写因子を発現できるベクターであればいずれも用いることができ、例えば3. (1) 記載のベクターをあげることができる。このように構築される転写因子の発現プラスミドをモレキュラー・クローニング第3版等の常法に準じて造成する。このような転写因子の発現プラスミドとして、Gal4-ERの発現プラスミドpGERbsrR2 (実施例18)、テトラサイクリン・コントロールド・トランスアクチベーターの発現プラスミドpTet-Off (クロンテック社製)、リバース・テトラサイクリン・コントロールド・トランスアクチベーターの発現プラスミドpTet-On (クロンテック社製)、ラクトース・レプレッサーの発現プラスミドpCMVLacI (ストラタジーン社製)、エクジソン受容体とレチノイン酸受容体RXRの発現プラスミドpERV3 (ストラタジーン社製)、pVgRXR (インビトロジェン社製) 等があげられる。

転写因子を発現させるための上記ベクターにおいて使用する動物細胞用の薬剤耐性遺伝子は、上述の誘導発現用ベクターに用いる動物細胞用の薬剤耐性遺伝子とは別の薬剤耐性遺伝子を用いることが望ましい。

転写因子の発現プラスミドを、6. (1) で取得したエプスタイン・バー・ウイルス

スのEBNA-1遺伝子を発現する無血清馴化したB細胞株に、6. (1) に記載した方法を用いて導入し、多数の形質転換株を取得する。上記の誘導発現用ベクターに、活性ペプチドの受容体をコードするDNAの代わりに、後述する6. (3) に記載のレポーター遺伝子を挿入したレポーター誘導発現プラスミドを作製し、これらの形質転換株に導入する。取得された形質転換株各々につき、転写を誘導するための薬剤等を添加することによりレポーター遺伝子の発現を誘導し、誘導しない時と誘導時のレポーター遺伝子の発現量を測定し、誘導発現の倍率（誘導時のレポーター発現量／非誘導時のレポーター発現量）を算出する。アッセイ細胞の構築において優れた性質を有する形質転換株（非誘導時の発現量が低く、誘導発現の倍率の高い形質転換株）を宿主細胞として選択する。

多数の形質転換株から選択しても、優れた性質を有する宿主細胞が得られない場合は、転写因子を発現するためのプロモーターの強さや、誘導発現プラスミド中のプロモーター配列等を検討し、再度、上記方法により宿主細胞の選定を行うとよい。

上記の方法で取得した優れた性質を有する宿主細胞として、Gal4-ER発現プラスミドpGERbsrR2をNamalwa KJM-1細胞に導入して染色体DNAに組み込んだ細胞株KJMGER8（実施例18）等があげられる。

KJMGER8を宿主、pGal9-ndまたはpAGal9-dを誘導発現用ベクターとして用いる宿主・ベクター系は、非誘導時の遺伝子発現のもれがなく、かつ遺伝子発現の誘導倍率が高い、極めて優れた誘導発現系である。

(3) レポーター系を組み込んだ宿主の構築

(a) レポータープラスミドの造成

レポーター遺伝子を挿入する発現用ベクターは、3. (1) に記載した活性ペプチド前駆体遺伝子を発現させるために用いるプラスミドベクターに、転写因子に対応する応答配列を有するプロモーターを導入することにより構築することができる。該プロモーターは、例えば3. (1) に記載した外来遺伝子の発現用プロモーターに1つ以上の応答配列を含むDNAを挿入することにより構築することもできる。

受容体のシグナルに応じたレポーター系の場合にはレポーター遺伝子の発現用プロモーターとしては、受容体のシグナルに応じた応答配列を有するものを用いる。例えば受容体がGPCRの場合、測定する活性ペプチドと結合するGPCRが共役す

るG蛋白質の種類に応じた応答配列を用いる。具体的には、 $G\alpha_s$ と共役するGPCRの場合はリガンドとの結合により細胞内cAMPを増加させるので、cAMP応答配列 (CRE) を、 $G\alpha_i$ と共役するGPCRの場合はリガンドとの結合により細胞内cAMPを減少せたり、MAPキナーゼカスケードを活性化するので、CREあるいは血清応答配列 (SRE) を、 $G\alpha_q$ 、 $G\alpha_{11}$ 、 $G\alpha_{15}$ または $G\alpha_{16}$ と共役するGPCRの場合は、リガンドとの結合によりプロテインキナーゼCを活性化したり、細胞内 Ca^{2+} を増加させるので、TPA 応答配列 (TRE) またはNFAT (nuclear factor of activated T cells) 応答配列を有するプロモーターを用いることができる。

プロモーター中の応答配列およびTATA配列に関しては、それぞれの配列、数、位置を検討することによって、感度やシグナル／ノイズ比の最適化を行うことができる。具体的には、検討するプロモーターを有するレポータープラスミドをそれぞれ造成し、(b) に後述するように、それぞれのレポータープラスミドを宿主細胞に導入して形質転換株を取得し、該形質転換株を刺激してレポーターを発現させ、非刺激時のレポーターの発現量が低く、非刺激時に対する刺激時のレポーター発現量の倍率が高いプロモーターを選ぶ。

レポーター遺伝子としては、いかなるレポーター遺伝子も利用できるが、例えば、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子、 β -ラクタマーゼ遺伝子、ホタル・ルシフェラーゼ遺伝子、ウミシイタケ・ルシフェラーゼ遺伝子、およびグリーン・フルオレッセント・プロテイン (GFP) 遺伝子を用いることができる [Mol. Biotechnol., 13, 29 (1999); Anal. Chem., 70, 579A (1998); J. Recept. Signal Transduct. Res., 19, 395 (1999); J. Recept. Signal Transduct. Res., 20, 189 (2000); Methods Mol. Biol., 130, 165 (2000)]。

動物細胞用の薬剤耐性遺伝子は、本レポータープラスミドを導入する宿主細胞にすでに導入されている動物細胞用の薬剤耐性遺伝子〔6. (1) もしくは (2) に記載した活性ペプチドの受容体をコードするDNAの発現プラスミドまたは6. (2) に記載した転写因子の発現用プラスミドに用いた動物細胞用の薬剤耐性遺伝子〕とは異なる動物細胞用の薬剤耐性遺伝子を用いるのが好ましい。レポーター遺伝子発現ユニットのプロモーターの最適化を行う際には、動物細胞での複製に必要な複製開始点として、宿主細胞の染色体外でプラスミドが安定に存在するエプス

タイン・バー・ウイルスのoriPを用いるのが好ましい。

以上のようにして造成されたレポータープラスミドとしては、GPCRのシグナルに応じた応答配列である16個のCREを有するプロモーターの制御下でホタル・ルシフェラーゼを発現するpACREpluc、同じく16個のCREを有するプロモーターの制御下でウシシイタケ・ルシフェラーゼを発現するpACRErlucをあげることができる。

(b) 宿主細胞へのレポーター系の組み込みとすぐれた形質転換株の選択

上記 (a) に記載の方法で造成したレポータープラスミドを、上記 (1) または (2) に記載の方法で構築した宿主細胞に導入し、多くの安定形質転換株を取得する。この中から、以下のようにして、アッセイ細胞の構築上すぐれた性質（刺激に対する応答性がよくバックグラウンドが低い）をもつ形質転換株を選択し、アッセイ細胞構築の宿主細胞とする。レポータープラスミドの導入法は、上記3. (1) に記載した方法を用いることができる。レポータープラスミドにエプスタイン・バー・ウイルスのoriPが含まれている場合は、制限酵素切断によりoriPを除去またはoriPの機能を破壊した後に宿主細胞に導入することにより、該プラスミドを宿主細胞の染色体に組み込むことができる。

取得された該形質転換株について、転写を誘導するための薬剤等で誘導した時と誘導しなかった時のレポーター遺伝子の発現量を比較し、刺激に対する応答性がよい細胞株を選択する。例えば、GPCRを発現させる宿主細胞においてCREを有するプロモーターを用いた場合は、フォルスコリンで細胞を刺激することによりレポーター遺伝子が発現させることができる。同様の宿主細胞でTREを用いた場合は、PMA（ホルボール12-ミリステート13-アセテート）でレポーター遺伝子が発現させることができる。その際、該応答配列からの転写を促す物質で刺激しない時のレポーター遺伝子の発現量（バックグラウンド）ができるだけ低い細胞株を選択する。GPCRのリガンドまたはアゴニストで細胞を刺激した時と刺激しなかった時のレポーター遺伝子の発現量を比較し、刺激に対する応答性がよい細胞株を選択することもできる。その際、刺激しない時のレポーター遺伝子の発現量（バックグラウンド）ができるだけ低い細胞株を選択する。例えば、Namalwa KJM-1およびKJMGER8は $G\alpha_s$ と共役する2a型アデノシン受容体(A2a)を内在的に発現しているので、これらの細胞に応答配列としてCREを含むレポータープラスミドを導入した形質転換株の場合は、A2aのアゴニストである5'-N-エチルカルボキサミドアデノシ

ン (NECA) を刺激物質として用いることができる。

レポーター遺伝子の発現量は、公知の方法 [Mol. Biotechnol., 13, 29 (1999); Anal. Chemi., 70, 579A (1998); J. Recept. Signal Transduct. Res., 19, 395 (1999); J. Recept. Signal Transduct. Res., 20, 189 (2000); Methods Mol. Biol., 130, 165 (2000)] にしたがって、レポーターポリペプチドの量や活性を指標に測定することができる。

以上のようにして作製した、レポーター系を組み込んだ、刺激に対する応答性がよくバックグラウンドの低い形質転換株として、例えばCREの制御下にホタル・ルシフェラーゼを発現するレポータープラスミドであるpACREplucをKJMGER8に導入したGBC7、およびCREの制御下にウミシイタケ・ルシフェラーゼを発現するレポータープラスミドであるpACRERlucをKJMGER8に導入したGBCR2等をあげることができる。

(4) G α 蛋白質またはキメラG α 蛋白質を組み込んだ宿主の構築

活性ペプチドと結合するGPCRが共役するG蛋白質によりシグナルが異なるため、いろいろなペプチドの活性測定を行う場合は、一般にはアッセイ方法を変える必要がある。すなわち、共役するG蛋白質ごとに、それに適したレポータープラスミドと該レポータープラスミドを導入した宿主細胞を構築する必要がある。その際、使用する宿主細胞によって、各G α 蛋白質の発現量が異なるため、G α 蛋白質と一緒に発現させた方がレポーター系の感度やシグナル／ノイズ比が上昇する場合がある。発現させるG α 蛋白質としては、G α_s 、G α_q 、G α_i 、G α_{11} 、G α_{12} 、G α_{13} 、G α_{14} 、G α_{15} 、G α_{16} 、G α_o 、G α_z 、G α_t またはG α_{gust} があげられる。また、G α_{15} またはG α_{16} は、多くのGPCRと共役してG α_o と同様のシグナルを流すことが知られている。したがって、G α_{15} またはG α_{16} を宿主細胞で発現させることにより、多くのGPCRのシグナルをNFAT応答配列やTREを用いたレポーター系で検出することができるようになる。G α_q 、G α_{11} 、G α_{15} またはG α_{16} と共役するGPCRの場合は、GPCRからのシグナルを細胞内Ca²⁺の上昇を指標にして検出することもできるが、G α_q 、G α_{11} 、G α_{15} またはG α_{16} を発現させた宿主細胞においては、リガンド刺激による細胞内Ca²⁺の上昇をより検出しやすくなる場合がある。

一方、G α_s のC末端の5アミノ酸を他のG α (G α_q 、G α_i 、G α_{11} 、G α_{12} 、G α_{14} 、G α_{15} 、G α_{16} 、G α_o 、G α_z 、G α_t 、またはG α_{gust}) の対応するアミノ酸に置換したキ

メラ $G\alpha_s$ を宿主細胞で発現させることにより、本来 $G\alpha_s$ 以外の $G\alpha$ に共役するGPCRが該キメラ $G\alpha_s$ と共役するようになり、該GPCRからのシグナルを $G\alpha_s$ を介したシグナルと同様にCREを用いたレポーター系で検出することができる。

また、 $G\alpha_q$ のC末端の5アミノ酸を他の $G\alpha$ ($G\alpha_s$ 、 $G\alpha_i$ 、 $G\alpha_{11}$ 、 $G\alpha_{12}$ 、 $G\alpha_{14}$ 、 $G\alpha_{15}$ 、 $G\alpha_{16}$ 、 $G\alpha_o$ 、 $G\alpha_z$ 、 $G\alpha_t$ 、または $G\alpha_{\text{gust}}$) の対応するアミノ酸に置換したキメラ $G\alpha_q$ を宿主細胞で発現させることにより、本来 $G\alpha_q$ 以外の $G\alpha$ に共役するGPCRが該キメラ $G\alpha_q$ と共役するようになり、該GPCRからのシグナルを $G\alpha_q$ を介したシグナルと同様に、NFAT応答配列やTREを用いたレポーター系で検出することができる。この時、細胞内 Ca^{2+} の上昇を指標にしてGPCRからのシグナルを検出することもできる。

したがって、例えば $G\alpha_s$ のC末端の5アミノ酸を $G\alpha_q$ の対応するアミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質と $G\alpha_s$ のC末端の5アミノ酸を $G\alpha_i$ の対応するアミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質の両者を、6. (3) で作製したCREの制御下でレポーター遺伝子を発現する宿主細胞で発現させることにより、 $G\alpha_s$ と共役するGPCRだけでなく、 $G\alpha_i$ と共役するGPCRおよび $G\alpha_q$ と共役するGPCRのシグナルも検出可能なアッセイ細胞の構築に有用な、汎用性のある宿主細胞を作製することができる。

上記6. (1) ~ (3) に記載の方法で構築したGPCRを発現するための宿主となる形質転換株 (例えばGBC7またはGBCR2) にキメラ $G\alpha$ 蛋白質遺伝子の発現ユニットを、以下の (a) および (b) に記載した方法により組み込むことができる。

(a) キメラ $G\alpha$ 蛋白質の発現プラスミドの造成

キメラ $G\alpha$ 蛋白質をコードするDNAは公知の方法 [Science, 249, 662 (1990); Nature, 363, 274 (1993); Mol. Pharmacol., 50, 885 (1996); FEBS lett., 406, 165 (1997); Mol. Pharmacol., 57, 13 (2000)] に準じて造成することができる。

該キメラ $G\alpha$ 蛋白質をコードするDNAを、上記3. (1) に記載した発現ベクターのプロモーターの下流に組み込むことにより、該キメラ $G\alpha$ 蛋白質の発現プラスミドを造成することができる。該キメラ $G\alpha$ 蛋白質発現プラスミドに用いる動物細胞用の薬剤耐性遺伝子は、6. (1) に記載した発現ベクター、6. (2) に記載した誘導発現ベクター、6. (2) に記載した転写因子の発現プラスミド、および6. (3) に記載したレポータープラスミドに用いた動物細胞用の薬剤耐性遺伝子とは異なる動物細胞用の薬剤耐性遺伝子を用いることが好ましい。

例えば、 $G\alpha_s$ のサブタイプである $G\alpha_{s4}$ のC末端の5アミノ酸を $G\alpha_q$ のC末端の5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質 ($G\alpha_{s-q}$) をコードするDNAを、発現プラスミド pAMoh に組み込むことにより、 $G\alpha_{s-q}$ の発現プラスミド pAMoh-Gs-q を造成することができる。また、 $G\alpha_{s4}$ のC末端の5アミノ酸を $G\alpha_i$ のC末端の5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質 ($G\alpha_{s-i}$) をコードするDNAを発現プラスミド pAMoh に組み込むことにより、 $G\alpha_{s-i}$ の発現プラスミド pAMoh-Gs-i を造成することができる。また、pAMoh-Gs-q および pAMoh-Gs-i を用いて、 $G\alpha_{s-q}$ および $G\alpha_{s-i}$ を共発現するためのプラスミド pAMopGs-qMoGs-i を造成することができる。

プラスミドの代わりに、該キメラ $G\alpha$ 蛋白質を発現するウイルスを使用することもできる。

(b) 宿主細胞へのキメラ $G\alpha$ 蛋白質遺伝子発現ユニットの組み込み

上記 (a) に記載の方法で造成された任意のキメラ $G\alpha$ 蛋白質発現プラスミドを、上記6. (1) ~ (3) に記載の方法で構築した宿主細胞に3. (1) に記載の方法に準じて導入することにより、安定形質転換株を取得することができる。キメラ $G\alpha$ 蛋白質発現プラスミドにエプスタイン・バー・ウイルスのoriPが含まれている場合は、制限酵素切断によりoriPを除去またはoriPの機能を破壊した後に宿主細胞に導入することにより、キメラ $G\alpha$ 蛋白質発現プラスミドを宿主細胞の染色体に組み込むことができる。

6. (3) に記載の方法で構築したレポーター系を組み込んだ宿主細胞にキメラ $G\alpha$ 蛋白質発現プラスミドを導入して取得した安定形質転換株の場合は、上記6. (3) (b) に記載の方法と同様にして、GPCRのリガンドまたはアゴニストで刺激した時と刺激しなかった時のレポーター遺伝子の発現量を指標として、性質の優れた (刺激に対する応答性がよく、バックグラウンドが少ない) 形質転換株を選択することができる。

6. (1) または (2) に記載の方法で構築したレポータープラスミドを組み込んでいない宿主細胞にキメラ $G\alpha$ 蛋白質発現プラスミドを導入して取得した安定形質転換株の場合は、個々の形質転換株にGPCR発現プラスミドとキメラ $G\alpha$ 蛋白質に対応した応答配列を有するレポータープラスミドを共導入し、上記と同様にして性質の優れた (刺激に対する応答性がよく、バックグラウンドが少ない) 形質転換株を選択することができる。

以上のようにして構築した宿主細胞として、例えばGBC7にpAMopGs-qMoGs-iを導入した形質転換株から選択されたGBCC13、GBCR2にpAMopGs-qMoGs-iを導入した形質転換株から選択されたGBCRC6等をあげることができる。GBCC13を用いることにより、 $G\alpha_s$ 、 $G\alpha_q$ および $G\alpha_i$ に共役するGPCRからのシグナルを、ホタル・ルシフェラーゼの活性を指標に検出することができる。GBCRC6を用いることにより、 $G\alpha_s$ 、 $G\alpha_q$ および $G\alpha_i$ に共役するGPCRからのシグナルを、ウミシイタケ・ルシフェラーゼの活性を指標に検出することができる。

(5) アッセイ系の構築

(a) レポーターを用いるアッセイ系

6. (1) (b) または (2) (a) に記載した方法で活性ペプチドの受容体の発現プラスミドを作製し、該プラスミドを6. (3) または (4) で構築した宿主細胞に導入して得られる安定形質転換株をアッセイ細胞として用いることができる。

6. (1) または (2) で構築した宿主細胞に、上記活性ペプチドの受容体の発現プラスミドと上記 (3) (a) に記載した方法で構築できるレポータープラスミドを共導入して得られる安定形質転換株をアッセイ細胞として用いることもできる。

6. (1) または (2) で構築した宿主細胞に、上記活性ペプチドの受容体の発現プラスミド、上記レポータープラスミド、および上記6. (4) (a) に記載した方法で構築できるキメラ $G\alpha$ 蛋白質の発現プラスミドを共導入して得られる安定形質転換株をアッセイ細胞として用いることもできる。上記レポータープラスミドと上記キメラ $G\alpha$ 蛋白質の発現プラスミドの代わりに、キメラ $G\alpha$ 蛋白質の発現ユニットを組み込んだレポータープラスミドを用いることもできる。

6. (3) で構築した宿主細胞に、上記活性ペプチドの受容体の発現プラスミドと上記キメラ $G\alpha$ 蛋白質の発現プラスミドを共導入して得られる安定形質転換株をアッセイ細胞として用いることもできる。

6. (2) ~ (4) で構築した宿主細胞は、それぞれの細胞に組み込まれたベクターが有する薬剤耐性遺伝子に応じた選択用薬剤を適当な量添加した培地を用いて培養するのが好ましい。培養は6. (1) (a) に記載の方法で行うことができる。例えば、KJMG8はプラストサイジンS ($2.0\mu\text{g/ml}$) を添加した培地、GBC7およびGBCR2はプラストサイジンS ($2.0\mu\text{g/ml}$) とハイグロマイシンB ($300\mu\text{g/ml}$) を添加した培地、GBCC13およびGBCRC6はプラストサイジンS ($2.0\mu\text{g/ml}$)、ハイ

グロマイシンB (300 μ g/ml) およびピューロマイシン (2.0 μ g/ml) を添加した培地で培養することが好ましい。

安定形質転換株の取得は、導入したプラスミドに含まれる薬剤耐性遺伝子に応じた選択用薬剤を適当な量添加した培地で培養することにより行うことができる。例えば、G418耐性遺伝子を有するpAGal9-ndを用いた発現ベクターを宿主細胞GBRC6に導入した場合、0.5mg/mlのジェネティシン含む培地を用いる。該培地には、上記の宿主を培養する際に添加するのが好ましい薬剤も同時に添加するのが好ましい。

活性ペプチドの受容体の誘導発現を行う場合は、(2)に記載したように誘導発現に必要な転写因子を発現する宿主細胞を用い、該転写因子に対応した応答配列を有する誘導発現用ベクターを用いる。例えば、GBCC13またはGBRC6のように誘導発現のためにGal4-ERを発現させた宿主細胞を用いる場合は、Gal4p応答配列を含む誘導発現ベクターであるpAGal9-ndまたはpAGal9-d等を活性ペプチドの受容体の発現プラスミドの造成に用いる。

6. (1) (b)に記載した発現プラスミドのように構成的プロモーターによる発現の場合は、アッセイ細胞を培養するだけで、活性ペプチドの受容体をアッセイ細胞の細胞表面に発現させることができる。誘導発現の場合は6. (2)に記載した誘導発現に必要な薬剤を添加して、上記で構築したアッセイ細胞を培養することにより、活性ペプチドの受容体をアッセイ細胞の細胞表面に発現させる。例えば、Gal4-ERを発現させた宿主細胞にGal4p応答配列を含む活性ペプチドの受容体の誘導発現プラスミドを導入して得られるアッセイ細胞の場合は、0.1~1000nmol/Lの、好ましくは0.1~10nmol/Lの17- β エストラジオールを添加して、3時間以上、好ましくは6~48時間培養することにより、活性ペプチドの受容体をアッセイ細胞の細胞表面に発現させることができる。

細胞表面に活性ペプチドの受容体を発現したアッセイ細胞に、活性を測定する試料を添加して2~24時間、好ましくは6時間培養後、公知の方法〔Mol. Biotechnol., 13, 29 (1999); Anal. Chemi., 70, 579A (1998); J. Recept. Signal Transduct. Res., 19, 395 (1999); J. Recept. Signal Transduct. Res., 20, 189 (2000); Methods Mol. Biol., 130, 165 (2000)〕にしたがって、レポーター遺伝子の発現量、レポーターポリペプチドの発現量、またはレポーターポリ

ペプチドの活性を測定する。コントロールとして、種々の濃度の活性ペプチド標品、該活性ペプチドを含まない試料、または活性ペプチド前駆体遺伝子を導入しない細胞株の培養上清等を用いて同様のアッセイを行う。コントロールの結果と比較することにより、試料中の活性ペプチドを検出、測定することができる。

既知のGPCRの代わりに、ペプチドをリガンドとすることが明らかになっていないGPCR、あるいはオーファンGPCRを用いたアッセイ細胞を構築した場合には、該GPCRのリガンドペプチドを同定することができる。また、上記4.で記載した活性ペプチド前駆体遺伝子の発現クローニングの際に、これらのアッセイ細胞を用いて活性測定を行うことにより、新規な活性ペプチド前駆体遺伝子を探索することができる。

(b) レポーターを用いないアッセイ系

6. (1) (b) または (2) (a) に記載した方法で活性ペプチドの受容体の発現プラスミドを作製し、該プラスミドを6. (1) ~ (4) で構築した宿主細胞に導入して得られる安定形質転換株をアッセイ細胞として用いることができる。アッセイ細胞の取得、培養、および細胞表面へのペプチド受容体の発現は、上記 (a) と同様にして行うことができる。また、上記1.で取得した不死化細胞をアッセイ細胞として用いることもできる。

受容体への活性ペプチドの結合により生ずるアッセイ細胞内でのシグナルを測定することによって、試料中の該ペプチドを検出することができる。細胞内でのシグナルは受容体に依存しており、例えばアラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺上昇、細胞内cAMP生成、細胞内cAMP減少、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質（例えば、CREB、STAT1、STAT2、STAT3、STAT4、STAT5a、STAT5b、STAT6、MAPキナーゼ、ATF-2、c-Jun、c-fos、I κ -B α 、I κ -B β 、Smad1、Smad2、Smad3、Smad5、Smad8等）のリン酸化、c-fos活性化、細胞内pHの変動、細胞増殖等をあげることができ、文献に記載の方法〔J. Biol. Chem., 271, 1857 (1996); Science, 268, 98 (1995); J. Pharmacol. Exp. Ther., 275, 1274 (1995); J. Biol. Chem., 272, 1822 (1997); J. Recept. Signal Transduct. Res., 17, 57 (1997); Endocrinology 138, 1400 (1997); Endocrinology 138, 1471 (1997); Nat. Biotechnol., 16, 1334 (1998); Biochem. Biophys. Res. Commun., 251, 471 (1998); Brit. J. Pharmacol., 125,

1387 (1998); Trends Biotechnol., 15, 487 (1997); Anal. Biochem., 252, 115 (1997); Nature, 358, 325 (1992); Nature, 393, 272 (1998); Cell, 92, 573 (1998); J. Biol. Chem., 272, 27497 (1997); Trends Pharmacol. Sci., 18, 430 (1997); Trends Pharmacol. Sci., 20, 370 (1999); W098/46995] に準じて測定できる。また、受容体への活性ペプチドの結合により、発現量変動する遺伝子あるいは発現量や状態が変動する蛋白質を測定することにより、受容体に結合する活性ペプチドを検出することもできる。

既知のGPCRの代わりに、ペプチドをリガンドとすることが明らかになっていないGPCR、あるいはオーファンGPCRを用いたアッセイ細胞を構築した場合には、該GPCRのリガンドペプチドを同定することができる。また、上記4.で記載した活性ペプチド前駆体遺伝子の発現クローニングの際に、これらのアッセイ細胞を用いて活性測定を行うことにより、新規な活性ペプチド前駆体遺伝子を探索することができる。

[II] 宿主・ベクター系の利用

上記 [I] 6.で構築した宿主・ベクター系は、活性ペプチドの受容体のアッセイ系の構築だけでなく、以下のことにも利用できる。

1. 任意のGPCRのアッセイ系の構築と該アッセイ系を用いた任意のGPCRのリガンド、アゴニストまたはアンタゴニストの探索

(a) レポーターを用いるアッセイ系

[I] 6. (1) (b) または [I] 6. (2) (a) に記載した方法と同様にして任意のGPCRの発現プラスミドを作製し、[I] 6. (5) (a) と同様にしてアッセイ細胞を構築し、該GPCRを細胞表面に発現させる。該細胞に、ペプチド、化合物等任意の物質を被検物質として添加して培養後、レポーター遺伝子の発現量を測定し、コントロール（物質を溶解させた溶媒のみを添加して培養した場合）と比べてレポーター遺伝子の発現量が増加する物質を選択することにより、該GPCRのリガンドまたはアゴニストを取得することができる。

該被検物質に関しては、GPCR遺伝子を挿入していないコントロールベクターを導入したアッセイ細胞を用いて同様の被検物質の添加実験を行い、レポーター遺伝子の発現量を増加させない場合に、該物質がGPCRの情報伝達系やレポーター遺伝子の転写に作用しているのではなく、GPCRに作用するリガンドまたはアゴニスト

であることを確認できる。該リガンドまたはアゴニストに関して、他のGPCRを発現させたアッセイ細胞を用いて同様の実験を行うことにより、該リガンドまたはアゴニストのGPCR特異性を評価することができる。

また、任意のGPCRを発現させたアッセイ細胞に、該GPCRのリガンドまたはアゴニストおよび被検物質として任意の物質を添加して培養後、レポーター遺伝子の発現量を測定し、コントロール（リガンドまたはアゴニストのみを添加した場合）と比べてレポーター遺伝子の発現量が減少する物質を選択することにより、該GPCRのアンタゴニストを取得することができる。

該物質に関しては、他のGPCRを発現させたアッセイ細胞と該GPCRのアゴニストを用いて同様の実験を行い、レポーター遺伝子の発現量を減少させない場合に、該物質がGPCRの情報伝達系やレポーター遺伝子の転写に作用しているのではなく、特定のGPCRのみに作用するアンタゴニストであることが確認できる。

(b) レポーターを用いないアッセイ系

上記 (a) において、レポーター遺伝子の発現を測定する代わりに、[I] 6. (5) (b) に記載したアッセイ細胞内でのシグナルを測定する方法を用いて測定を行うことにより、任意のGPCRのリガンド、アゴニストまたはアンタゴニストの探索を行うことができる。

2. 任意のGPCRの構成的活性の評価

誘導発現系を用いたGPCRのアッセイ系において、任意のGPCR遺伝子を一過的に高発現させることにより、該GPCRの構成的活性を測定することができる。

GPCRの誘導発現に必要な転写因子を発現し、レポーター系を組み込んだ [I] 6. (3) または [I] 6. (4) に記載の方法で構築された宿主細胞に、[I] 6. (2) (a) に記載した方法で作製した任意のGPCRの誘導発現プラスミドを導入して得られる安定形質転換株を評価用の細胞として用いる。

[I] 6. (5) と同様にして、該形質転換細胞の該GPCRを誘導発現させ、GPCRを誘導発現させない場合とでレポーター遺伝子の発現量を比較する。GPCRを誘導発現した時にレポーター遺伝子の発現量が増加する場合、該GPCRは構成的活性を有すると判定できる。このようにして、構成的活性を示すGPCR（構成活性型GPCR）を選択することができる。

3. 構成活性型GPCRを用いたインバースアゴニストまたはアゴニストの探索

2.と同様にして任意の構成活性型GPCRを誘導発現できるアッセイ細胞を構築する。該細胞に、ペプチド、化合物等任意の物質を被検物質として添加後、該GPCRを誘導発現させ、レポーター遺伝子の発現量を測定し、コントロール（物質を溶解させた溶媒のみを添加した場合）と比べてレポーター遺伝子の発現量が減少する物質を選択することにより、該構成活性型GPCRのインバースアゴニストを取得できる。

コントロールと比べてレポーター遺伝子の発現量が増加する物質を選択することにより、該構成活性型GPCRのアゴニストを取得できる。

該物質に関しては、GPCR遺伝子を挿入していないコントロールベクターを導入したアッセイ細胞を用いて同様の被検物質の添加実験を行い、レポーター遺伝子の発現量を変化させない場合に、該被検物質がGPCRの情報伝達系やレポーター遺伝子の転写に作用しているのではなく、GPCRに作用するインバースアゴニストまたはアゴニストであることを確認できる。該インバースアゴニストまたはアゴニストに関して、他の構成活性型GPCRを発現させたアッセイ細胞を用いて同様の実験を行うことにより、該インバースアゴニストまたはアゴニストのGPCR特異性を評価することができる。

また、[II] 1.と同様にして該構成活性型GPCRのアゴニストと任意の物質を添加して培養後、レポーター遺伝子の発現量を測定し、コントロール（アゴニストのみを添加した場合）と比べてレポーター遺伝子の発現量が減少する物質を選択し、さらにアゴニストを添加しないで該物質のみを添加した場合には、アゴニストも該物質も添加しない場合と比較して、レポーター遺伝子の発現量が減少しない物質を該GPCRのアンタゴニスト（ニュートラルアンタゴニスト）として選択することができる。該アンタゴニストに関して、他の構成活性型GPCRを導入したアッセイ細胞を用いて同様の実験を行うことにより、該アンタゴニストのGPCR特異性を評価することができる。

4.発現クローニング

細胞や組織から単離したcDNAを [I] 6. (1) (b) または [I] 6. (2) (a) に記載した発現ベクターに挿入することによりcDNAライブラリーを作製する。

cDNAソースとして、ヒトまたは動物のいかなる組織や細胞も使用することができる。例えば、ヒトや動物由来の各種組織、細胞、または細胞株を用いることが

できる。

これら細胞よりmRNAを取得し、該mRNAより2本鎖cDNAを合成し、該cDNAを [I] 6. (1) (b) または [I] 6. (2) (a) に記載した発現用ベクターのプロモーターの下流に挿入して組換えベクターを作製後、該組換えベクターを大腸菌に導入してcDNAライブラリーを作製する。以上のcDNAライブラリーの作製はモレキュラー・クローニング第3版、特開平05-336963等に記載の公知の方法に準じて行うことができる。得られたcDNAライブラリー（該組換えベクターを導入した大腸菌）を適当な濃度に希釈して寒天培地上で培養し、出現した個々のコロニーをクローンとして単離することができる。また、各クローン（大腸菌）からそれぞれcDNAクローンとしてプラスミド（組換えベクター）を単離できる。プラスミドはモレキュラー・クローニング第3版等に記載の常法あるいはQIAprep 96 Turbo Miniprep Kit（キアゲン社製）等のキットを用いて単離できる。

該cDNAライブラリーを1～10000クローン（大腸菌）ずつ、好ましくは10～100クローンずつのプールに分け、各プールごとに大腸菌を培養しプラスミド（cDNAクローンの混合物）を単離する。得られた各プール由来の組換えベクターをそれぞれ、[I] 6. (3) (b) または [I] 6. (4) (b) で作製したレポーター系を組み込んだ宿主細胞に、[I] 3. (1) に記載の方法で導入し、[I] 6. (5) に記載の方法で安定形質転換株を得る。

得られた安定形質転換株を [I] 6. (5) に記載の方法で培養し、各cDNAクローンを発現させる。該形質転換株のレポーター遺伝子の発現量を測定し、同時にcDNAを発現させない場合（誘導発現の場合は発現を誘導しない場合、構成的発現の場合は空ベクターを導入した宿主細胞）のレポーター遺伝子の発現量も測定する。両者を比較し、cDNAを発現させた場合にレポーター遺伝子の発現量が上昇したプールを選択する。選択したプールについて、再度より細かくプール分けし、同様の操作を行う。この工程を繰り返し、最終的に1クローンごとに上記の操作を行なうことにより、宿主細胞中のレポーター遺伝子の発現を制御している応答配列からの転写を増加させる活性を有する分子（例えば、構成活性型GPCR、転写因子、シグナル伝達分子、または酵素等）をコードするcDNAを取得することができる。

また、上記と同様にして形質転換株に各プールのcDNAを発現させた後、該形質

転換株に任意の物質を添加して2～12時間（好ましくは6時間）培養後、レポーター遺伝子の発現量を測定し、同時に任意の物質を添加しないで培養した場合のレポーター遺伝子の発現量も測定する。両者を比較し、任意の物質を添加した場合にレポーター遺伝子の発現量が上昇したプールを選択する。選択したプールについて、再度より細かくプール分けし、同様の操作を行う。この工程を繰り返し、最終的に1クローンごとに上記の操作を行なうことにより、任意の物質に反応してレポーター遺伝子の発現を制御している応答配列からの転写を増加させるペプチド（例えば、任意の物質をリガンドまたはアゴニストとするGPCR、任意の物質が存在した時に活性化または不活性化する転写因子、任意の物質が存在した時に活性化または不活性化するシグナル伝達分子、あるいは任意の物質が存在した時に活性化または不活性化する酵素等）をコードするcDNAを取得することができる。

また、以下のようにしてプール分けしないで発現クローニングを行うこともできる。

上記の方法で調製した全cDNAライブラリーから常法あるいはPlasmid Maxi Kit（キアジェン社製）等のキットを用いてプラスミドを調製する。該プラスミドを、細胞表面分子あるいはGFP等の生きた細胞のままで検出可能な分子をレポーターとして発現することのできる宿主細胞に導入して、安定形質転換株を取得する。上記と同様にしてcDNAを発現後、これら検出可能な分子の発現の高い細胞を取得する。あるいは、cDNAを発現させた細胞に任意の物質を添加して培養した後、該分子の発現の高い細胞を取得する。該分子が細胞表面分子の場合は、該分子を認識する抗体で細胞を染色した後、蛍光活性化セルソーター（fluorescence activated cell sorter；以下、FACSと略記する）を用いて、抗体への結合能が高い細胞を分取する。該分子がGFPの場合は、FACSを用いてGFPの発現量が高い細胞を分取する。分取した細胞を培養後、同様の操作を繰り返すことにより、cDNAを発現した時に該分子の発現が増加する細胞、あるいは任意の物質を添加した時に該分子の発現が増加する細胞を濃縮することができる。該細胞から、公知の方法、例えば、ハート法〔Mol. Cell. Biol., 8, 2837 (1988)〕により、導入プラスミドを回収することができる。該プラスミドを再度宿主細胞に導入し、同様の操作を行うことにより、該プラスミド中のcDNAを発現した時に該分子の発現が増加するかどうか、あるいは該cDNAを発現した細胞に任意の物質を添加した時に該分子

の発現が増加するかどうかを確認することができる。

上記の方法により取得されたcDNAの塩基配列は、該DNA断片をそのままあるいは適当な制限酵素等で切断後、モレキュラー・クローニング第3版等に記載の常法によりベクターに組み込み、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー (Sanger)らのジデオキシ法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463 (1977)]、あるいは市販のキット (Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit, dRhodamine Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kitまたは BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit, アプライド・バイオシステムズ社製) とABI PRISM 377 (アプライド・バイオシステムズ社製) 等のDNAシーケンサーを用いて決定することができる。該塩基配列より、取得したcDNAがコードするペプチドのアミノ酸配列を決定することができる。

このようにして得られたペプチドの発現プラスミドを、[II] 1.または [II] 3. に記載の方法に準じて作製し、アッセイ細胞を構築する。ペプチドが構成的にあるいは活性化を受けて転写を活性化作用を有する場合は、任意の物質を添加して培養後、レポーター遺伝子の発現量を測定することにより、該ペプチドの阻害剤または活性化剤を選択し、取得することができる。

5. 構成活性型の変異GPCRの造成

構成活性型ではないGPCRをコードするDNAに、文献 [モレキュラー・クローニング第3版; Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, (1987-2001) (以下、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーと称す); Nucleic Acids Res., 10, 6487 (1982); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6409 (1982); Gene, 34, 315 (1985); Nucleic Acids Res., 13, 4431 (1985); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 48 (1985); Methods Mol. Biol., 57, (1996); BioTechniques, 25, 958 (1998); BioTechniques, 25, 958 (1998); BioTechniques, 24, 428 (1998); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 9670 (1996)] に記載の方法に準じて、部位特異的変異あるいはランダム変異を導入する。

変異導入したGPCRをコードするDNAを、[I] 6. (2) (a) に記載した誘導発現用ベクターのプロモーターの下流に挿入して、多数の変異導入DNAのライブラリーを作製する。[II] 4.記載の方法と同様にして、該変異導入DNAライブラリーをプール分けした後、各プールのDNAを [I] 6. (3) または [I] 6. (4) 記載のレポー

ター系および誘導発現に必要な転写因子の発現ユニットを組み込んだ宿主細胞に導入し、安定形質転換株を取得する。[II] 2.記載の方法にしたがって、DNAの発現を誘導した時としない時のレポーター遺伝子の発現を比較し、発現を誘導した時にレポーター遺伝子の発現量が増加するプールを選択する。選択したプールについて再度より細かくプール分けし、同様の操作を行う。この工程を繰り返し、最終的に1クローンごとに上記の操作を行なうことにより、構成活性型の変異GPCRをコードするDNAを取得することができる。[II] 4.記載の方法を用いて、FACSを用いて選択を行うこともできる。

変異の部位や変異するアミノ酸の種類によって該変異導入DNAがコードするGPCRの構成的活性の強さや、リガンド、アゴニスト、またはアンタゴニストに対する反応性が変化する。インバースアゴニストやアゴニストの探索のためには、リガンド、アゴニスト、およびアンタゴニストに対する特異性が天然型GPCRと変わらないことが望ましいが、このような変異型GPCRは、これまでの知見〔J. Biol. Chem., 271, 1857 (1996); Science, 268, 98 (1995); J. Pharmacol. Exp. Ther., 275, 1274 (1995); J. Biol. Chem., 272, 1822 (1997); J. Recept. Signal Transduct. Res., 17, 57 (1997); Mol. Neurobiol., 17, 109 (1998); J. Biol. Chem., 274, 18574 (1999); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 7615 (2000); Mol. Pharmacol., 57, 890 (2000); W098/46995〕を参考に、リガンド、アゴニスト、およびアンタゴニストに対する特異性が天然型GPCRと比較して変化しない確率の高い部位〔例えば、第3膜貫通領域の後半から第2細胞内領域の前半部分、上記領域中に存在し、多くのGPCRで保存された (AspまたはGlu)-Arg Tyr配列 (以下、D/ERYモチーフとよぶ) に対応する各アミノ酸、第3細胞内領域の後半から第6膜貫通領域の前半部分〕にランダムに変異導入することにより取得することができる。また、第6膜貫通領域中に存在する多くのG蛋白質共役型受容体で保存されたプロリン残基 (プロリン残基が保存されていないG蛋白質共役型受容体の場合は該プロリン残基の位置に対応するアミノ酸残基) から数えて (該プロリン残基を0番目として) N末側に20残基目あるいは22残基目のアミノ酸にランダムに変異導入することにより取得することができる。また、GPCRをコードするDNAの全域に渡ってランダムに変異を導入して、その中から構成活性型のGPCRを選択し、目的にあった変異体かどうかを評価することにより、インバースアゴニストを感

度よく、高いシグナル／ノイズ比で探索するのに適した、構成的活性の強い変異体を選択することができる。

構成活性型になった変異型GPCRに導入された変異の部位と種類（アミノ酸置換、欠失、付加）を決定することにより、任意のGPCRの構造と活性の相関についての情報を得ることができる。構成活性型の変異GPCRは、しばしば疾患の原因となっているため、該情報をもとに疾患との関連を調べることができる。

また、使用した転写因子応答配列（例えば、CREやNF κ B応答配列）からの転写を直接または間接的に増加させる活性を有する分子（例えば、転写因子、シグナル伝達分子、または酵素等）に関しても、上記と同様にしてランダム変異を導入することにより、構成活性型の変異体を取得することができる。

また、上記分子にランダム変異を入れることによって、構成的活性を示さなくなった変異体やドミナントネガティブ変異体を取得することもできる。

【III】 視床下部および膵臓ランゲルハンス氏島由来の不死化細胞株の利用

1. 本発明の細胞株を用いた、薬物、生理活性物質、受容体の探索法または評価法

本発明の方法により、内分泌細胞、例えば視床下部細胞、ランゲルハンス氏島細胞等の形質を保持する多種の細胞株を取得することが可能となったため、これらの細胞株を用いると、様々な内分泌細胞、例えば視床下部細胞、ランゲルハンス氏島細胞等に作用する物質（ペプチド、化合物、薬物等）を効率よく探索または評価することが初めて可能となった。

また、本発明の細胞株を用いれば、特定の内分泌細胞を多量に増やすことが可能なため、特定の内分泌細胞で発現する受容体や生理活性物質を取得することが可能である。

以下（a）および（b）に視床下部由来あるいはランゲルハンス氏島由来の細胞株を用いた具体例をあげる。

（a）上記【I】 1.（1）で取得した多種の視床下部由来細胞株の混合物あるいは個々の視床下部由来細胞株、または多種のランゲルハンス氏島由来細胞株の混合物あるいは個々のランゲルハンス氏島由来細胞株と任意の物質（ペプチド、化合物、薬物等）を接触させ、任意の物質に対する該細胞の反応性を調べることにより、該細胞株に作用する物質を探索または評価することができる。

細胞の培養法としては上記【I】 1.（1）あるいは【I】 1.（4）に示した方法を

使用することができる。

任意の物質への細胞の反応性の測定は、例えば、上記 [I] 6. (5) (b) で記載したアッセイ細胞の反応を測定する方法に準じて行うことができる。

細胞と接触させる薬物としてはいかなる薬物も使用することができるが、例えば、視床下部に作用して薬効を示す薬物（抗肥満薬、悪液質治療薬、抗アレルギー薬、抗免疫薬、抗炎症薬、腫瘍治療薬、ウイルス治療薬、および精神神経作用薬等）、ランゲルハンス氏島に作用して薬効を示す薬物（抗糖尿病薬、悪液質治療薬、抗免疫薬、抗炎症薬、腫瘍治療薬、ウイルス治療薬、および抗肥満薬等）、視床下部あるいはランゲルハンス氏島での副作用が問題となる薬物、あるいは視床下部細胞あるいはランゲルハンス氏島細胞に発現する分子（例えば種々の受容体等）を標的とした薬物を使用することができる。

細胞と接触させるペプチドとしてはいかなるペプチドも使用できるが、例えば、受容体未知のペプチド、あるいは機能未知の分泌蛋白質、膜蛋白質、ペプチドを使用することができる。該ペプチドの代わりに、該ペプチドを発現する細胞を用いることもできる。

細胞と接触させる化合物としてはいかなる化合物も使用できるが、例えば、動物の生体中に存在することが知られている物質を使用することができる。

該細胞株に作用する物質が見つかった場合は、該物質に反応する細胞株から、該物質と相互作用する分子（受容体、酵素、転写因子等）を取得することができる。該物質と相互作用する分子の取得法としては、例えば、該物質との親和性を利用した精製法、あるいは発現クローニング法を使用することができる。

(b) 本発明の細胞株を各種条件下で培養した後の培養液、細胞、または該細胞の抽出液を用いて、生理活性物質を探索することができる。培養法としては、上記 [I] 1. (1) あるいは [I] 1. (4) に記載した方法を用いることができる。

例えば、任意の蛋白質（受容体、酵素、転写因子等）を発現させた細胞および該蛋白質を発現させていない細胞に、それぞれ上記の細胞株の培養液、細胞、または該細胞の抽出液を接触させ、任意の蛋白質（受容体、酵素、転写因子等）を発現させた細胞の方が強く反応するかどうかを調べることによって、任意の蛋白質に作用する生理活性物質を探索することができる。

細胞の反応性の測定は、例えば、上記 [I] 6. (5) (b) に記載したアッセイ細

胞の反応を測定する方法に準じて行うことができる。

培養液中、細胞中、または細胞抽出液中に活性が検出された場合は、一般的な方法〔Spectrometric Identification of Organic Compounds, 6th Edition, John Wiley & Sons (1997)〕を用いて、生理活性物質を単離し、その構造（全構造または部分構造）を決定することができる。生理活性物質がペプチドである場合は、一般的な方法〔遺伝子クローニングのためのタンパク質構造解析、東京化学同人、(1993)〕を用いて決定した構造（全構造または部分構造）を基に、対応する遺伝子を取得することができる。生理活性物質がペプチドである場合は、活性を示した細胞をソースとして作製したcDNAライブラリーや遺伝子ライブラリーを用いた発現クローニングによって活性物質をコードする遺伝子を取得し、活性物質の構造を明らかにすることができる。

2. 視床下部細胞あるいはランゲルハンス氏島細胞で発現する有用遺伝子、有用ペプチドの取得法

視床下部およびランゲルハンス氏島には多種の細胞が存在しており、それぞれの細胞は生体の恒常性の維持に重要な特定の機能を果たしていると考えられる。それらの機能は、視床下部細胞あるいはランゲルハンス氏島細胞が発現する各種の受容体や各種の生理活性物質の働きを介して発揮される。特定の視床下部細胞あるいは特定のランゲルハンス氏島細胞で特異的に発現する遺伝子やペプチドは、その細胞特異的な機能に関与していると考えられる。中でも特定の視床下部細胞あるいは特定のランゲルハンス氏島細胞で特異的に発現する分泌ペプチドは、生理活性物質として機能している可能性が高い。また、視床下部細胞あるいはランゲルハンス氏島細胞を刺激した時に発現が変動する遺伝子も、視床下部細胞あるいはランゲルハンス氏島細胞の機能を調節する上で重要な受容体や生理活性物質をコードしている可能性が高いと考えられる。

したがって、特定の視床下部細胞あるいは特定のランゲルハンス氏島細胞で特異的に発現する遺伝子やペプチドを探索することによって、該細胞の機能発現に重要なペプチド（各種受容体、各種生理活性物質、各種転写因子等）あるいはそれらをコードする遺伝子を取得できると考えられる。本発明で取得した視床下部細胞あるいはランゲルハンス氏島細胞の形質を保持する細胞株を用いれば、1種類の視床下部細胞あるいはランゲルハンス氏島細胞を多量に増やすことが可能な

ため、特定の視床下部細胞あるいは特定のランゲルハンス氏島細胞で特異的に発現している遺伝子やペプチドを取得することが可能になる。本発明では、視床下部細胞あるいはランゲルハンス氏島細胞の形質を保持する多種の細胞株を取得することに成功したため、様々な視床下部細胞あるいはランゲルハンス氏島細胞で特異的に発現している遺伝子やペプチド、特定の視床下部細胞あるいは特定のランゲルハンス氏島細胞を刺激した際に発現が変動する遺伝子やペプチド、あるいは特定の視床下部細胞あるいはランゲルハンス氏島細胞で発現される分泌蛋白質等の探索と取得が可能となった。以下 (a)、(b)、(c) および (d) に具体例をあげる。また、(a) ~ (d) の方法で取得したラット視床下部細胞あるいはラットランゲルハンス氏島細胞由来の遺伝子への相同性を利用して、ヒトやマウス等の他の哺乳類の対応する遺伝子を取得することができる。

(a) シグナルシーケンスストラップ法を用いた分泌シグナル配列を有するペプチドをコードする遺伝子の取得

ペプチド性のリガンドや、細胞表面に存在する受容体は、一般にシグナル配列を有していることから、本発明の任意の細胞株をソースとして用いてシグナルシーケンスストラップ法 [Science, 261, 600 (1993); Nat. Biotechnol., 17, 487 (1999)] を行うことにより、該細胞株で発現しているリガンドや受容体を効率的に取得することができる。

神経ペプチドやホルモン、あるいはそれらの受容体は、各種の刺激でその遺伝子の発現量が変動することが知られている。したがって、各種の刺激を行った本発明の細胞株をソースとしてシグナルシーケンスストラップ法を行うことにより、該細胞株で発現しているリガンドや受容体をより効率的に取得することができる。

細胞株の培養法または刺激法としては、上記 [I] 1. (1) および [I] 1. (4) に記載した方法を用いることができる。

シグナルシーケンスストラップ法で使用するcDNAは部分断片であるため、該cDNAの配列に特異的なプローブを用いたハイブリダイゼーションにより全長cDNAを取得する。該全長cDNAの塩基配列を決定することにより、該cDNAがコードするペプチドを同定することができる。

該ペプチドのアミノ酸配列対して、相同性検索、モチーフ検索、あるいは疎水性検索を行うことによって、該ペプチドの機能を推定することができる。例えば、

上記解析により、該ペプチドが、受容体、リガンド、トランスポーター、酵素等として機能するかどうかを推定することができる。分泌シグナル配列や膜貫通領域を有するかどうかを調べることにより、該ペプチドが分泌蛋白質か膜蛋白質かを確認することもできる。

該ペプチドをコードするDNAを適当な細胞で発現させることにより、該ペプチドを生産し、該ペプチドの活性を実験的に調べることができる。例えば、発現方法として、下記3.で示す方法に準じた方法をあげることができる。

(b) 特定の細胞株で特異的に発現している遺伝子の取得

該取得方法としては、二つの異なるサンプル間で発現が異なる遺伝子を取得する方法である、サブトラクション法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 5738 (1988)〕やrepresentational difference analysis〔Nucleic Acids Res., 22, 5640 (1994)〕による方法をあげることができる。また、DNAチップ法〔蛋白質核酸酵素, 45, 1841 (2000); 日本臨床, 57, 465 (1999)〕等を用いて個々の細胞株で発現している遺伝子を解析し、他の細胞株で発現している遺伝子と比較することにより、各細胞株で特異的に発現している遺伝子を同定することができる。

以下、サブトラクション法を用いた例を記す。

本発明の任意の細胞株より作製したcDNAライブラリーに対して、該細胞株以外の細胞（例えば、同じ組織（視床下部またはランゲルハンス島）由来で異なる形質を示す細胞株、または別の組織由来の細胞または細胞株）より取得したmRNAを用いてサブトラクションを行う。該細胞株特異的な遺伝子を濃縮した差分cDNAライブラリーを調製した後、該差分cDNAライブラリー中の挿入cDNAの塩基配列を5'側からランダムに決定する。決定した配列に特異的なプライマーを作製し、該プライマーを用いたPCRを行うことにより、差分に使用した2種類の細胞における該配列を有する遺伝子の発現量を調べることができる。これにより、該細胞株において特異的に発現する遺伝子を同定することができる。

特異的に発現する遺伝子に対応するcDNAの全塩基配列を決定することにより、該cDNAがコードするペプチドを同定することができる。差分ライブラリー中のcDNAが部分断片である場合、該cDNAの配列に特異的なプローブを用いたハイブリダイゼーションにより、全長cDNAを取得することができる。該全長cDNAの塩基配列を決定することにより、該cDNAがコードするペプチドを同定することができる。

該ペプチドのアミノ酸配列に対して、相同性検索、モチーフ検索、あるいは疎水性検索を行うことによって、該ペプチドの機能を推定することができる。例えば、上記解析により、該ペプチドが、受容体、リガンド、転写因子、トランスポーター、酵素等として機能するかどうかを推定することができる。分泌シグナル配列や膜貫通領域を有するかどうかを調べることにより、該ペプチドが分泌蛋白質か膜蛋白質かを決定することもできる。

該ペプチドをコードするDNAを適当な細胞で発現させることにより、該ペプチドを生産し、該ペプチドの活性を実験的に調べることもできる。

また、差分化したcDNAを用いて、上記のシグナルシーケンストラップ法を行うことにより、本発明の任意の細胞株で特異的に発現しているリガンドや受容体を効率よく取得することができる。サブトラクションが可能なベクターを用いてシグナルシーケンストラップ用のライブラリーを作製することにより、サブトラクションとシグナルシーケンストラップを効率的に行うことができる。

(c) リガンドや受容体をコードする遺伝子の効率的取得

神経ペプチドやホルモン、あるいはそれらの受容体は、各種の刺激でその遺伝子の発現量が変動することが知られている。したがって、各種の刺激を行った本発明の任意の細胞株について、各種刺激を行った場合と行わない場合で発現が変動する遺伝子を比較することによってリガンドや受容体をコードする遺伝子をより効率的に取得することができる。具体的な方法としては、上記 (b) で記載したサブトラクション法、representational difference analysis法、またはDNAチップ法を用いることができる。培養法および刺激法としては、上記 [I] 1. (1) および [I] 1. (4) に記載した方法を用いることができる。

サブトラクション法で取得した差分化したcDNAを用いて、上記のシグナルシーケンストラップ法を行うことにより、本発明の任意の細胞株を刺激した際に発現が変動するリガンドや受容体を効率よく取得することができる。サブトラクションが可能なベクターを用いてシグナルシーケンストラップ用のライブラリーを作製することにより、サブトラクションとシグナルシーケンストラップを効率的に行うことができる。

(d) 特定の細胞株で特異的に発現しているペプチドや、あるいは特定の細胞株を刺激した際に発現が変動するペプチドの同定および取得

一般に知られているプロテオミクスの手法〔Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics, Springer (1997); Proteome and Protein Analysis, Springer (2000)〕を用いて解析し、特定の細胞株で特異的に発現しているペプチド、あるいは特定の細胞株を刺激した際に発現が変動するペプチドを同定することができる。市販されている機器を用いることもできる。

例えば、本発明の任意の細胞株を各種条件下で培養後、培養液または細胞の抽出液中に存在するペプチドを解析する。他の細胞株の培養液または抽出液中に存在するペプチドについても同様の解析を行い、両者の結果を比較することで、特定の細胞株で特異的に発現しているペプチドを同定することができる。視床下部由来細胞株で特異的に発現している分泌ペプチドは、神経ペプチドやホルモンとして作用することが期待される。したがって、視床下部由来細胞株の培養液中に特異的に存在するペプチドを同定することにより、神経ペプチドやホルモンを取得することが可能と考えられる。

また、神経ペプチドやホルモンは各種の刺激で発現量や分泌量が発変動することが知られている。したがって、任意の視床下部細胞株を異なる条件下で培養し、培養条件により発現が発変動する分泌ペプチドを同定することにより、神経ペプチドやホルモンを効率的に取得することが可能と考えられる。

培養法または刺激法としては、上記 [I] 1. (1) および [I] 1. (4) に記載した方法を用いることができる。

上記で取得したペプチドの部分アミノ酸配列は公知の方法を用いて決定することができる。また、公知の方法を用いて、該アミノ酸配列を基に対応する遺伝子を取得することができる。

3. 視床下部細胞またはランゲルハンス氏島細胞で発現するペプチドの生産法

[I] 4. または [III] 2. に記載の方法で取得されたペプチドをコードする遺伝子あるいは、該遺伝子との相同性を利用して取得される、ヒトやマウス等の他の哺乳類の対応する遺伝子を適当な宿主細胞中で発現させることにより、該遺伝子がコードするペプチドを製造することができる。方法としては、モレキュラー・クローニング第3版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された方法等を用いることができる。

即ち、本発明の細胞株が発現するペプチドをコードする遺伝子を適当な発現ベ

クターのプロモーター下流に挿入した組換え体ベクターを造成し、該ベクターを宿主細胞に導入することにより、該ペプチドを発現する形質転換体を取得し、該形質転換体を培養することにより、該ペプチドを製造することができる。

宿主細胞としては、原核細胞、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、目的とする遺伝子を発現できるものであればいずれも用いることができる。また、動物個体や植物個体を用いることができる。

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製が可能、または染色体中への組込みが可能で、発現させる遺伝子（仮にA遺伝子と呼ぶ）の転写に適した位置にプロモーターを含有しているものを用いることができる。

細菌等の原核生物を宿主細胞として用いる場合、A遺伝子の発現ベクターは、原核生物中で自立複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、A遺伝子、転写終結配列、より構成されていることが好ましい。プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

発現ベクターとしては、例えば、pLEX（インビトロジェン社製）、pRSET（インビトロジェン社製）、pGEMEX-1（プロメガ社製）、pQE-30（キアジェン社製）、pKYP10（特開昭58-110600）、pKYP200〔Agric. Biol. Chem., 48, 669 (1984)〕、pLSA1〔Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)〕、pGEL1〔Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 82, 4306 (1985)〕、pCAL-n（ストラタジーン社製）、pTrs30（FERM BP-5407）、pTrs32（FERM BP-5408）、pGHA2（FERM BP-400）、pGKA2（FERM B-6798）、pTerm2（特開平3-22979、US5342775）、pKK233-2（アマシャム・バイオサイエンス社製）、pGEX（アマシャム・バイオサイエンス社製）、pET3-a（ノバジェン社製）、pSupex、pUB110、pTP5、pC194、pMAL-c2X（ニューイングランド・バイオラブズ社）等を例示することができる。

プロモーターとしては、大腸菌等の宿主細胞中で転写を開始できるものであればいかなるものでもよい。例えば、trpプロモーター（Ptrp）、lacプロモーター（Plac）、P_Lプロモーター、P_Rプロモーター等の、大腸菌やファージ等に由来するプロモーター、SP01プロモーター、SP02プロモーター、penPプロモーター等をあげることができる。またPtrpを2つ直列させたプロモーター（Ptrp×2）、tacプロモーター、lacT7プロモーター、let Iプロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。

リボソーム結合配列としては、シャイン-ダルガノ (Shine-Dalgarno) 配列と開始コドンとの間を適当な距離 (例えば6~18塩基) に調節したプラスミドを用いることが好ましい。

A遺伝子の発現には転写終結配列は必ずしも必要ではないが、好適には構造遺伝子直下に転写終結配列を配置することが望ましい。

宿主細胞としては、エシェリヒア属、セラチア属、バチルス属、プレビバクテリウム属、コリネバクテリウム属、ミクロバクテリウム属、シュードモナス属等に属する微生物、例えば、Escherichia coli XL1-Blue、Escherichiacoli XL2-Blue、Escherichia coli DH1、Escherichia coli MC1000、Escherichia coli KY3276、Escherichia coli W1485、Escherichia coli JM109、Escherichia coli HB101、Escherichia coli No.49、Escherichia coli W3110、Escherichia coli NY49、Escherichia coli BL21(DE3)、Escherichia coli BL21(DE3)pLysS、Escherichia coli HMS174(DE3)、Escherichia coli HMS174(DE3)pLysS、Serratia ficaria、Serratia fonticola、Serratia liquefaciens、Serratia marcescens、Bacillus subtilis、Bacillus amyloliquefaciens、Brevibacterium ammoniagenes、Brevibacterium immariophilum ATCC14068、Brevibacterium saccharolyticum ATCC14066、Corynebacterium glutamicum ATCC13032、Corynebacterium glutamicum ATCC14067、Corynebacterium glutamicum ATCC13869、Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870、Microbacterium ammoniaphilum ATCC15354、Pseudomonas sp. D-0110等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、上記宿主細胞へDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Nucleic Acids Res., 16, 6127 (1988)]、カルシウムイオンを用いる方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)]、プロトプラスト法 (特開昭63-248394)、Gene, 17, 107 (1982)やMol. Gen. Genet., 168, 111 (1979)に記載の方法等をあげることができる。

酵母菌株を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YEpl3 (ATCC37115)、YEp24 (ATCC37051)、YCp50 (ATCC37419)、pHS19、pHS15等を例示することができる。プロモーターとしては、酵母菌株中で転写を開始できるものであればいかなるものでもよく、例えば、PH05プロモーター、PGKプロモ

ーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、gal 1プロモーター、gal 10プロモーター、ヒートショック蛋白質プロモーター、MF α 1プロモーター、CUP 1プロモーター等のプロモーターをあげることができる。

宿主細胞としては、サッカロマイセス属、シゾサッカロマイセス属、クルイベロミセス属、トリコスポロン属、シワニオミセス属等に属する酵母菌株をあげることができ、具体的には、Saccharomyces cerevisiae、Schizosaccharomyces pombe、Kluyveromyces lactis、Trichosporon pullulans、Schwanniomyces alluvius等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法〔Methods. Enzymol., 194, 182 (1990)〕、スフェロプラスト法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 1929 (1978)〕、酢酸リチウム法〔J. Bacteriol., 153, 163(1983)〕、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978)記載の方法等をあげることができる。

動物細胞を宿主細胞とする形質転換体は〔I〕3.に記載の方法により取得することができる。

宿主細胞としては、マウス・ミエローマ細胞、ラット・ミエローマ細胞、マウス・ハイブリドーマ細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞であるCHO細胞、BHK細胞、アフリカミドリザル腎臓細胞、ヒトの細胞であるNamalwa細胞またはNamalwa KJM-1細胞、ヒト胎児腎臓細胞、ヒト白血病細胞、HBT5637 (特開昭63-299)、ヒト大腸癌細胞株等をあげることができる。

マウス・ミエローマ細胞としては、SP2/0、NS0等、ラット・ミエローマ細胞としてはYB2/0等、ヒト胎児腎臓細胞としてはHEK293、293等、ヒト白血病細胞としてはBALL-1等、アフリカミドリザル腎臓細胞としてはCOS-1、COS-7、ヒト大腸癌細胞株としてはHCT-15等をあげることができる。

上記〔I〕の3.に記載したように、本発明の不活化細胞株を用いることもできる。

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えば、Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, NewYork (1992)、モレキュラー・バイオロジー第3版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された方法によって、ヘブチドを発現することができる。

即ち、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、ペプチドを発現させることができる。

該方法において用いられる遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392（ファーマンジェン社製）、pVL1393（ファーマンジェン社製）、pBlueBac4.5（インビトロジェン社製）等をあげることができる。

バキュロウイルスとしては、例えば、ヤガ科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフィア・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス（*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*）等を用いることができる。

昆虫細胞としては、*Spodoptera frugiperda*の卵巣細胞、*Trichoplusia ni*の卵巣細胞、カイコ卵巣由来の培養細胞等を用いることができる。*Spodoptera frugiperda*の卵巣細胞としてはSf9、Sf21〔Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, New York (1992)〕等、*Trichoplusia ni*の卵巣細胞としてはHigh Five（インビトロジェン社製）等、カイコ卵巣由来の培養細胞としては*Bombyx mori* N4等をあげることができる。

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法（特開平2-227075）、リポフェクション法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)〕等をあげることができる。

また、動物細胞にDNAを導入する方法と同様の方法を用いて、昆虫細胞にDNAを導入することもでき、例えば、エレクトロポレーション法〔Cytotechnology, 3, 133 (1990)〕、リン酸カルシウム法（特開平2-227075）、リポフェクション法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)〕等をあげることができる。

植物細胞または植物個体を宿主として用いる場合には、公知の方法〔組織培養, 20 (1994); 組織培養, 21 (1995); Trends in Biotechnology, 15, 45 (1997)〕に準じて本発明の細胞株が発現するペプチドを生産することができる。

遺伝子発現に用いるプロモーターとしては、植物細胞中で転写を開始できるものであればいずれも用いることができ、例えば、カリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーター、イネアクチン1プロモーター等をあげることができる。また、

プロモーターと発現させる遺伝子の間に、トウモロコシのアルコール脱水素酵素遺伝子のイントロン1等を挿入することにより、遺伝子の発現効率をあげることもできる。

宿主細胞としては、ジャガイモ、タバコ、トウモロコシ、イネ、アブラナ、大豆、トマト、小麦、大麦、ライ麦、アルファルファ、亜麻等の植物細胞等をあげることができる。組換えベクターの導入方法としては、植物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) (特開昭59-140885、特開昭60-70080、W094/00977)、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990); 特開昭60-251887]、パーティクルガン (遺伝子銃) を用いる方法 (特許第2606856、特許第2517813) 等をあげることができる。

遺伝子を導入した植物の細胞や器官は、ジャーファーマンターを用いて大量培養することができる。また、遺伝子導入した植物細胞を再分化させることにより、遺伝子が導入された植物個体 (トランスジェニック植物) を造成することもできる。

動物個体を用いて本発明の細胞株が発現するペプチドを生産することもできる。例えば、公知の方法 [Am. J. Clin. Nutr., 63, 639S (1996); Am. J. Clin. Nutr., 63, 627S (1996); Bio/Technology, 9, 830 (1991)] に準じて、該ペプチドをコードする遺伝子を導入した動物中に該ペプチドを生産することができる。

プロモーターとしては、動物で転写を開始できるものであればいずれも用いることができるが、例えば、乳腺細胞特異的なプロモーターである α カゼインプロモーター、 β カゼインプロモーター、 β ラクトグロブリンプロモーター、ホエー酸性プロテインプロモーター等が好適に用いられる。

本発明の細胞株が発現するペプチドをコードする遺伝子を組み込んだ組換え体ベクターを保有する微生物、動物細胞、あるいは植物細胞由来の形質転換体を、通常の培養方法に従って培養し、該ペプチドを生成蓄積させ、該培養物より該ペプチドを採取することにより、該ペプチドを製造することができる。

形質転換体が動物個体または植物個体の場合は、通常の方法に従って、飼育または栽培し、該ペプチドを生成蓄積させ、該動物個体または植物個体より該ペプチドを採取することにより、該ペプチドを製造することができる。

即ち、動物個体の場合、例えば、該ペプチドをコードする遺伝子を保有する非ヒトトランスジェニック動物を飼育し、該ペプチドを該動物中に生成・蓄積させ、該動物中より該ペプチドを採取することにより、該ペプチドを製造することができる。該動物中の生成・蓄積場所としては、例えば、該動物のミルク、卵等をあげることができる。

植物個体の場合、例えば、該ペプチドをコードする遺伝子を保有するトランスジェニック植物を栽培し、該ペプチドを該植物中に生成蓄積させ、該植物中より該ペプチドを採取することにより、該ペプチドを製造することができる。

該ペプチドを製造するための形質転換体が大腸菌等の原核生物、酵母菌等の真核微生物である場合、これら生物を培養する培地は、該生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれでもよい。

炭素源としては、該形質転換体が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含む糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノール等のアルコール類が用いられる。

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の各種無機酸や有機酸のアンモニウム塩、その他含窒素化合物、並びに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体およびその消化物等が用いることができる。

無機塩としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。

培養は、振盪培養または深部通気攪拌培養等の好氣的条件下で行う。培養温度は15～40℃がよく、培養時間は、通常16～96時間である。培養中pHは、3.0～9.0に保持する。pHの調整は、無機あるいは有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニア等を用いて行う。

また培養中必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル- β -D-チオガラクトシド等を、trpプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸等を培地に添加してもよい。

該ペプチドを製造するための形質転換体が動物細胞である場合、該細胞を培養する培地は、一般に使用されているRPMI1640培地〔J. Am. Med. Assoc., 199, 519 (1967)〕、EagleのMEM培地〔Science, 122, 501 (1952)〕、DMEM培地〔Virology, 8, 396 (1959)〕、199培地〔Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 73, 1 (1950)〕またはこれら培地にFCS等を添加した培地等を用いることができる。

培養は、通常pH6~8、30~40°C、5%CO₂存在下等の条件下で1~7日間行う。

また培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

昆虫細胞を宿主細胞として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているTNM-FH培地（ファーマンジェン社製）、Sf-900 II SFM培地（ギブコ社製）、ExCell400、ExCell405〔いずれもJ R Hバイオサイエンス（JRH Biosciences）社製〕、グレース（Grace）の昆虫培地〔Nature, 195, 788 (1962)〕等を用いることができる。

pH6~7、培養温度25~30°Cがよく、培養時間は、通常1~5日間である。

また、培養中必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

遺伝子の発現方法としては、ペプチド全長を発現させる以外に、部分ペプチドを発現させることもできる。

上記のペプチド全長または部分ペプチドは、細胞内に単独で発現させる以外に、モレキュラー・クローニング第3版に記載されている方法等に準じて、分泌タンパク質または融合タンパク質として発現させることもできる。融合させるタンパク質としては、 β -ガラクトシダーゼ、プロテインA、プロテインAのIgG結合領域、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ、ポリアルギニン、ポリグルタミン酸、プロテインG、マルトース結合タンパク質、グルタチオンS-トラン

スフェラーゼ、ポリヒスチジン鎖 (His-tag)、S ペプチド、DNA結合タンパク質ドメイン、Tac抗原、チオレドキシン、グリーン・フルオレッセント・プロテイン、FLAGペプチド、および任意の抗体のエピトープなどがあげられる〔実験医学, 13, 469 (1995)〕。

本発明の細胞株が発現するペプチド (部分ペプチドを含む) の生産方法としては、宿主細胞内に生産させる方法、宿主細胞外に分泌させる方法、あるいは宿主細胞外膜上に生産させる方法があり、使用する宿主細胞や、生産させるペプチドの構造を変えることにより、該方法を選択することができる。

該ペプチド (部分ペプチドを含む) が宿主細胞内あるいは宿主細胞外膜上に生産される場合、ボールソンらの方法〔J. Biol. Chem., 264, 17619 (1989)〕、ロウらの方法〔Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86, 8227 (1989); Genes Develop., 4, 1288 (1990)〕、または特開平05-336963、W094/23021等に記載の方法を準用することにより、該ペプチドを宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

すなわち、遺伝子組換えの手法を用いて、該ペプチド (部分ペプチドを含む) の手前にシグナルペプチドを付加した形で発現させることにより、目的のペプチドを宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。さらに、シグナルペプチドと該ペプチドの間、または該ペプチドのC末端に、精製・検出用のタグを付加することもできる。

精製・検出用のタグとしては、 β -ガラクトシダーゼ、プロテインA、プロテインAのIGG結合領域、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ、ポリアルギニン、ポリグルタミン酸、プロテインG、マルトース結合タンパク質、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、ポリヒスチジン鎖 (His-tag)、S ペプチド、DNA結合タンパク質ドメイン、Tac抗原、チオレドキシン、グリーン・フルオレッセント・プロテイン、FLAGペプチド、および任意の抗体のエピトープなどがあげられる〔実験医学, 13, 469 (1995)〕。

また、特開平2-227075に記載されている方法に準じて、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子等を用いた遺伝子増幅系を利用して生産量を上昇させることもできる。

該ペプチド (部分ペプチドを含む) を製造するための形質転換体の培養物から、該ペプチドを単離・精製するには、通常の酵素の単離・精製法を用いることがで

きる。例えば、該ペプチドが形質転換体の細胞内に溶解状態で蓄積する場合には、培養物を遠心分離することにより、培養物中の細胞を集め、該細胞を洗浄した後、超音波破砕機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破砕し、無細胞抽出液を得る。

該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られた上清から、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル (DEAE) -セファロース、DIAION HPA-75 (三菱化学社製) 等レジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF (ファルマシア社製) 等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を用い、精製標品を得ることができる。

また、該ペプチド (部分ペプチドを含む) が細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後破砕し、遠心分離を行うことにより得られた沈殿画分より、通常の方法により該ペプチドを回収後、該ペプチドの不溶体をペプチド変性剤で可溶化する。該可溶化液を、ペプチド変性剤を含まないあるいはペプチド変性剤の濃度がペプチドが変性しない程度に希薄な溶液に希釈、あるいは透析し、該ペプチドを正常な立体構造に再構成させた後、上記と同様の単離精製法により精製標品を得ることができる。

細胞外に該ペプチドが分泌される場合には、該培養物を遠心分離等の手法により処理し、可溶性画分を取得する。該可溶性画分から、上記無細胞抽出液上清からの単離精製法と同様の手法により、該ペプチドの精製標品を得ることができる。

また、該ペプチド (部分ペプチドを含む) を他のタンパク質との融合タンパク質として生産し、融合したタンパク質に親和性をもつ物質を用いたアフィニティークロマトグラフィーを利用して精製することもできる〔実験医学, 13, 469 (1995)〕。例えば、ロウらの方法〔Proc.Natl.Acad.Sci.,USA, 86, 8227 (1989); Genes Develop., 4, 1288 (1990)〕、特開平05-336963、W094/23021に記載の方法に準じて、該ペプチドをプロテインAとの融合タンパク質として生産し、イムノグロブリンGを用いるアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる。また、該ペプチドをFLAGペプチドとの融合タンパク質として生産し、抗

F LAG抗体を用いるアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる〔Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86, 8227 (1989); Genes Develop., 4, 1288 (1990)〕。

さらに、該ペプチド自身に対する抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーで精製することもできる。

また、公知の方法〔J. Biomol. NMR, 6, 129 (1995); Science, 242, 1162 (1988); J. Biochem., 110, 166 (1991)〕に準じて、in vitro転写・翻訳系を用いて該ペプチドを生産することができる。

さらに、該ペプチドは、Fmoc法（フルオレニルメチルオキシカルボニル法）、tBoc法（T-ブチルオキシカルボニル法）等の化学合成法によっても製造することができる。また、アドバンスト・ケムテック（Advanced ChemTech）社、アプライド・バイオシステムズ社、アマシャムバイオサイエンス社、島津製作所等のペプチド合成機を利用し化学合成することもできる。

精製した該ペプチドの構造解析は、蛋白質化学で通常用いられる方法、例えば「遺伝子クローニングのためのタンパク質構造解析」（平野久著、東京化学同人発行、1993年）に記載の方法により実施可能である。

4. 視床下部細胞またはランゲルハンス氏島細胞で発現するペプチドを認識する抗体の取得法

[I] 5. または [III] 3. に記載した方法で取得されたペプチドを抗原として用いて、視床下部細胞やランゲルハンス島細胞で発現するペプチドを認識する抗体を取得することができる。合成したペプチドを抗原として用いることもできる。また、本発明の細胞株あるいは該細胞株から調製した細胞膜画分を抗原として用いることにより、該細胞株の表面抗原を特異的に認識する抗体を取得することができる。

ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の作製法を下記 (i) および (ii) に記す。

(i) ポリクローナル抗体の作製

上記3.の方法により取得したペプチドの全長または部分断片精製標品、あるいは該ペプチドの一部のアミノ酸配列を有するペプチド（部分ペプチド）を抗原として用い、動物に投与することによりポリクローナル抗体を作製することができ

る。また、本発明の細胞株あるいは該細胞株から調製した細胞膜画分を抗原として用いることもできる。

投与する動物として、ウサギ、ヤギ、3~20週令のラット、マウス、ハムスター等を用いることができる。該抗原の投与量は動物1匹当たり50~100 μ gが好ましい。部分ペプチドを用いる場合は、部分ペプチドをキーホール・リンベット・ヘモシアニン (keyhole limpet haemocyanin) や牛チログロブリンなどのキャリア蛋白に共有結合させたものを抗原とするのが望ましい。抗原とする部分ペプチドは、ペプチド合成機で合成することができる。本発明の細胞株を抗原として用いる場合は、動物1匹当たり3~5 $\times 10^5$ cellsを投与する。該細胞株から調製した細胞膜画分を抗原として用いる場合は、動物1匹当たり1~10mgを投与する。

該抗原の投与は、1回目の投与の後1~2週間おきに3~10回行う。各投与後、3~7日目に眼底静脈叢より採血し、該血清が免疫に用いた抗原と反応することを固相酵素免疫検定法 (ELISA) [酵素免疫測定法：医学書院刊1976年、Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)] 等で確認する。

免疫に用いた抗原に対し、その血清が十分な抗体価を示した非ヒトほ乳動物より血清を取得し、該血清を分離、精製することによりポリクローナル抗体を取得することができる。

分離、精製する方法としては、遠心分離、40~50%飽和硫酸アンモニウムによる塩析、カプリル酸沈殿 [Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)]、またはDEAE-セファロースカラム、陰イオン交換カラム、プロテインAまたはG-カラムあるいはゲル濾過カラム等を用いるクロマトグラフィー等を、単独または組み合わせて処理する方法があげられる。

(ii) モノクローナル抗体の作製

(a) 抗体産性細胞の調製

(i) で免疫に用いた本発明の細胞株が発現するペプチドまたは該ペプチドの部分断片、部分ペプチドに対し、その血清が十分な抗体価を示したマウスまたはラットを抗体産生細胞の供給源として供する。

該抗体価を示したマウスまたはラットに抗原物質を最終投与した後3~7日目に、脾臓を摘出する。該脾臓をMEM培地 (日水製薬社製) 中で細断し、ピンセットでほぐし、1,200rpmで5分間遠心分離した後、上清を捨てる。得られた沈殿画分の脾細

胞をトリス-塩化アンモニウム緩衝液 (pH7.65) で1~2分間処理し赤血球を除去した後、MEM培地で3回洗浄し、得られた脾細胞を抗体産生細胞として用いる。

(b) 骨髓腫細胞の調製

骨髓腫細胞としては、マウスまたはラットから取得した株化細胞を使用する。

例えば、8-アザグアニン耐性マウス (BALB/c由来) 骨髓腫細胞株P3-X63Ag8-U1 [Curr. Top. Microbiol. Immunol., 81, 1 (1978); Eur. J. Immunol., 6, 511 (1976)]、SP2/0-Ag14 [Nature, 276, 269 (1978)]、P3-X63-Ag8653 [J. Immunol., 123, 1548 (1979)]、P3-X63-Ag8 [Nature, 256, 495 (1975)] 等を用いることができる。

これらの細胞株は、8-アザグアニン培地 [RPMI1640培地に1.5mmol/Lグルタミン、50μmol/L 2-メルカプトエタノール、10μg/mLゲンタマイシンおよび10%ウシ胎児血清 (FCS) を加えた培地 (以下、正常培地という) に、さらに15μg/mL 8-アザグアニンを加えた培地] で継代するが、細胞融合の3~4日前に正常培地で培養し、融合には該細胞を 2×10^7 個以上用いる。

(c) ハイブリドーマの作製

(a) で取得した抗体産生細胞と (b) で取得した骨髓腫細胞をMEM培地またはPBS (リン酸二ナトリウム 1.83g、リン酸一カリウム 0.21g、食塩 7.65g、蒸留水 1リットル、pH7.2) でよく洗浄し、細胞数が、抗体産生細胞：骨髓腫細胞=5~10:1になるよう混合し、1,200rpmで5分間遠心分離した後、上清を捨てる。

得られた沈澱画分の細胞群をよくほぐし、該細胞群に、攪拌しながら、37°Cで、 10^8 抗体産生細胞あたり、ポリエチレングリコール-1000 (PEG-1000) 2g、MEM 2mL およびジメチルスルフォキシド (DMSO) 0.7mLを混合した溶液を0.2~1mL添加し、さらに1~2分間ごとにMEM培地1~2mLを数回添加する。添加後、MEM培地を加えて全量が50mLになるように調製する。

該調製液を900rpmで5分間遠心分離後、上清を捨てる。得られた沈澱画分の細胞を、ゆるやかにほぐした後、メスピペットによる吸込み、吹出しでゆるやかにHAT培地 [正常培地にヒポキサンチン (0.1 mmol/L)、チミジン (15μmol/L) およびアミノプテリン (0.4μmol/L) を加えた培地] 100mL中に懸濁する。

該懸濁液を96穴培養用プレートに100μL/穴ずつ分注し、5% CO₂インキュベーター中、37°Cで7~14日間培養する。培養後、培養上清の一部をとりAntibodies:

A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14 (1988)等に述べられているELISAにより、本発明の細胞株が発現するペプチドと特異的に反応するハイブリドーマを選択する。

ELISAの具体的例として、以下の方法をあげることができる。免疫の際、抗原に用いた本発明の細胞株が発現するペプチド、該ペプチドの部分断片または部分ペプチドを適当なプレートにコートし、ハイブリドーマ培養上清もしくは後述の(d)で得られる精製抗体を第一抗体として反応させ、さらに第二抗体としてペルオキシダーゼ等の酵素で標識した抗ラットまたは抗マウスイムノグロブリン抗体を反応させた後に標識酵素に応じた発色反応を行ない、プレートにコートしたペプチド、該ペプチドの部分断片または部分ペプチドに特異的に反応するものを、本発明の細胞株が発現するペプチドを特異的に認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマとして選択する。

該ハイブリドーマを用いて、限界希釈法によりクローニングを2回繰り返し〔1回目は、HT培地（HAT培地からアミノプテリンを除いた培地）、2回目は、正常培地を使用する〕、安定して強い抗体価の認められたものを、本発明の細胞株が発現するペプチドを特異的に認識する抗体を産生するハイブリドーマ株として選択する。

(d) モノクローナル抗体の調製

プリスタン処理〔2,6,10,14-テトラメチルペンタデカン (Pristane) 0.5mLを腹腔内投与し、2週間飼育する〕した8～10週令のマウスまたはヌードマウスに、(c)で取得した本発明の細胞株が発現するペプチドを特異的に認識するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞 $5 \sim 20 \times 10^6$ 細胞/匹を腹腔内に注射する。10～21日間でハイブリドーマは腹水癌化する。該腹水癌化したマウスから腹水を採取し、3,000rpmで5分間遠心分離して固形分を除去する。得られた上清より、ポリクローナルで用いた方法と同様の方法でモノクローナル抗体を精製、取得することができる。

抗体のサブクラスの決定は、マウスモノクローナル抗体タイピングキットまたはラットモノクローナル抗体タイピングキットを用いて行う。蛋白質量は、ローリー法あるいは280nmでの吸光度より算出する。

5. 視床下部細胞またはランゲルハンス氏島細胞が発現するペプチドを認識する抗

体の利用法

上記4.で取得した抗体を用いて、細胞または組織を染色することにより、視床下部細胞またはランゲルハンス氏島細胞で発現するペプチドを発現している細胞を同定することができる。また、上記4.で取得した抗体を用いて細胞を染色後、FACSを用いて、視床下部細胞またはランゲルハンス氏島細胞で発現するペプチドを発現している細胞を単離することができる。

すなわち、上記 [III] 4.で取得した抗体を用いて、特定の視床下部細胞あるいは特定のランゲルハンス氏島細胞の分布を調べたり、特定の視床下部細胞あるいは特定のランゲルハンス氏島細胞を単離することができる。また、神経幹細胞、体性幹細胞、あるいはES細胞を各種培養条件で培養後、該抗体を用いて特定の視床下部細胞あるいは特定のランゲルハンス氏島細胞に分化した細胞を検出、単離することができる。

抗体を用いて抗原を免疫学的に検出および定量する方法としては、蛍光抗体法、酵素免疫抗体法 (EIA)、放射性物質標識免疫抗体法 (RIA)、免疫組織化学染色法や免疫細胞化学染色法、ウェスタンブロッティング法、ドットブロッティング法、免疫沈降法、サンドイッチELISA〔単クローン抗体実験マニュアル (講談社サイエンティフィック) (1987); 続生化学実験講座5, 免疫生化学研究法 (東京化学同人) (1986)〕等があげられる。

蛍光抗体法とは、本発明の細胞株が発現するペプチドを細胞内あるいは細胞外に発現した微生物、動物細胞あるいは昆虫細胞または組織に、該ペプチドを特異的に認識する抗体を反応させ、さらにフルオロセイン・イソチオシアネート (FITC) などの蛍光物質で標識した該抗体と反応する抗体 (例えば、該ペプチドまたはペプチドを特異的に認識する抗体がマウスIgGクラスの場合、抗マウスIgG抗体) を反応させた後、蛍光色素をフローサイトメーターで測定する方法である。

EIAとは、本発明の細胞株が発現するペプチドを含む測定試料に、該ペプチドを特異的に認識する抗体を反応させ、さらにペルオキシダーゼなどの酵素で標識した該抗体と反応する抗体 (例えば、該ペプチドまたはペプチドを特異的に認識する抗体がマウスIgGクラスの場合、抗マウスIgG抗体) を反応させた後、酵素による発色反応を行い、発色量を分光光度計で測定する方法である。

RIAとは、本発明の細胞株が発現するペプチドを含む測定試料に、該ペプチドを

特異的に認識する抗体を反応させ、さらに放射性同位体で標識した該抗体と反応する抗体（例えば、該ペプチドを特異的に認識する抗体がマウスIgGクラスの場合、抗マウスIgG抗体）を反応させた後、放射エネルギーをシンチレーションカウンターなどで測定する方法である。

免疫組織化学染色法や免疫細胞化学染色法とは、本発明の細胞株が発現するペプチドを細胞内あるいは細胞外に発現した微生物、動物細胞あるいは昆虫細胞または組織に、該ペプチドを特異的に認識する抗体を反応させ、さらにFITCなどの蛍光物質、ペルオキシダーゼ等の酵素、ビオチンなどで標識した該抗体と反応する抗体（例えば、該ペプチドを特異的に認識する抗体がマウスIgGクラスの場合、抗マウスIgG抗体）あるいはその断片を反応させた後、顕微鏡を用いて観察する方法である。

ウェスタンブロッティング法とは、本発明の細胞株が発現するペプチドを細胞内あるいは細胞外に発現した微生物、動物細胞あるいは昆虫細胞または組織の抽出液をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動〔Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)〕で分画した後、該ゲルをポリフッ化ビニリデン（PVDF）膜あるいはニトロセルロース膜にブロッティングし、該膜に該ペプチドを特異的に認識する抗体を反応させ、さらにFITCなどの蛍光物質、ペルオキシダーゼ等の酵素、ビオチンなどで標識した該抗体と反応する抗体（例えば、該ペプチドを特異的に認識する抗体がマウスIgGクラスの場合、抗マウスIgG抗体）あるいはその断片を反応させた後、標識物質に応じた反応を行う方法である。

ドットブロッティング法とは、本発明の細胞株が発現するペプチドを細胞内あるいは細胞外に発現した微生物、動物細胞あるいは昆虫細胞または組織の抽出液をニトロセルロース膜にブロッティングし、該膜に該ペプチドを特異的に認識する抗体を反応させ、さらにFITCなどの蛍光物質、ペルオキシダーゼ等の酵素、ビオチンなどで標識した該抗体と反応する抗体（例えば、該ペプチドを特異的に認識する抗体がマウスIgGクラスの場合、抗マウスIgG抗体）あるいは結合断片を反応させた後、標識物質に応じた反応を行う方法である。

免疫沈降法とは、本発明の細胞株が発現するペプチドを細胞内あるいは細胞外に発現した微生物、動物細胞あるいは昆虫細胞または組織の抽出液を、該ペプチドを特異的に認識する抗体と反応させた後、プロテインG-セファロース等イムノ

グロブリンに特異的な結合能を有する担体を加えて抗原抗体複合体を沈降させる方法である。

サンドイッチELISAとは、本発明の細胞株が発現するペプチドを特異的に認識する抗体を吸着させたプレートに、該ペプチドを細胞内あるいは細胞外に発現した微生物、動物細胞あるいは昆虫細胞または組織の抽出液を反応させた後、ペルオキシダーゼ等の酵素で標識した該ペプチドを特異的に認識する抗体（上記抗体とは抗原認識部位が異なる）を反応させ、標識物質に応じた反応を行う方法である

図面の簡単な説明

第1図 視床下部由来不死化細胞のSV40ラージT抗原の免疫染色を示す。

33°Cで培養したトランスジェニックラット胎児由来の不死化視床下部細胞の混合物について、(a)はSV40ラージT抗原の免疫染色の結果を、(b)は核染色の結果を示す。

第2図 トランスジェニックラット胎児由来の不死化視床下部細胞の混合物、SV40ラージT抗原の免疫染色の結果を示す。(a)は33°Cで培養した場合、(b)は39°Cで培養した場合を示す。

第3図 不死化視床下部細胞株AMN2-100を、10%血清を含む培地で温度を変えて培養した場合の細胞の形態を示す。(a)は33°Cで培養した場合、(b)は39°Cで培養した場合を示す。

第4図 不死化視床下部細胞株AMF2-20を、33°Cで培地を変えて培養した場合の細胞の形態を示す。(a)は10%血清を含む培地で培養した場合、(b)はDMEM/F-12 (N2) 培地で培養した場合、(c)はDMEM/F-12 (-FCS) 培地で培養した場合を示す。

第5図 不死化視床下部細胞株AMF2-20を、培地と温度を変えて培養した場合の細胞の形態を示す。(a)はDMEM/F-12 (FCS) 培地を用いて33°Cで8日間培養した場合、(b)はDMEM/F-12 (FCS) 培地を用いて37°Cで5日間培養後、培地をDMEM/F-12 (-FCS) 培地に交換してさらに37°Cで3日間培養した場合を示す。

第6図 トランスジェニックラット成体雌由来の不死化視床下部細胞の混合物について、レプチン受容体の免疫染色を行った結果を示す。

第7図 (a)は視床下部細胞株AMN2-25についてNPYの免疫染色を行った結果を

示す。(b)は抗NPY抗体を添加しないネガティブコントロールを示す。

第8図 不死化視床下部細胞株NC-12についてSTAT3の免疫染色を行った結果を示す。(a)はレプチン刺激をしない場合、(b)はレプチン刺激を加えた場合を示す。

第9図 不死化視床下部由来細胞株のスルホニルウレア刺激による細胞内カルシウム濃度の変化を示す。(a)はトランスジェニックラット成体雌の視床下部由来の不死化細胞の混合物を、(b)は不死化視床下部細胞株AMN2-25を用いた場合を示す。横軸は時間で、矢印で示した時点でHBSSバッファーまたはスルホニルウレアを細胞にそれぞれ添加した。縦軸は2励起波長での蛍光強度比でカルシウム濃度を表す。

第10図 ランゲルハンス氏島由来不死化細胞株F-8について、PC2の免疫染色および核染色を行った結果を示す。(a)および(b)はPC2の免疫染色を、(c)および(d)は核染色を示し、(a)および(c)はRPMI1640(05918)培地で培養した場合、(b)および(d)はRPMI1640(05918)で培養した細胞をDMEM(D-5796)培地に培地を置換し、2週間培養した場合を示す。

第11図 宿主細胞株GBCR2にpGal9-V2を導入した安定形質転換株のバソプレッシン刺激時のウミシイタケ・ルシフェラーゼ活性を示す。+エストロジェンは、 17β -エストラジオール刺激をしてV2遺伝子の誘導発現を行った場合、-エストロジェンは 17β -エストラジオール刺激をしない場合、それぞれの右側のバーはバソプレッシン刺激をした場合、左側のバーはバソプレッシン刺激をしない場合の活性を示す。縦軸はバソプレッシン刺激をしない場合の活性をそれぞれ1としたときの活性比を表す。

第12図 宿主細胞株GBCRC6にpGal9-V2を導入した安定形質転換株を、 17β -エストラジオールによりV2遺伝子発現誘導後、各種濃度のバソプレッシンで刺激したときのウミシイタケ・ルシフェラーゼ活性を示す。横軸はバソプレッシンの濃度 $[\log(\text{mol/L})]$ を、縦軸はバソプレッシン刺激をしない場合の活性を1としたときの活性比を表す。

第13図 宿主細胞株GBCRC6にpGal9-CRHR1を導入した安定形質転換株を、 17β -エストラジオールによりCRHR1遺伝子発現誘導後、各種濃度のコルチコトロピン放出ホルモンで刺激したときのウミシイタケ・ルシフェラーゼ活性を示す。横軸は

コルチコトロピン放出ホルモンの濃度〔log (mol/L) 〕を、縦軸はコルチコトロピン放出ホルモン刺激をしない場合の活性を1としたときの活性比を表す。

第14図 宿主細胞株GBCRC6にpAGal9-AT1を導入した安定形質転換株を、 17β -エストラジオールによりAT1遺伝子発現誘導後、各種濃度のアンジオテンシンIIで刺激したときのウミシイタケ・ルシフェラーゼ活性を示す。横軸はアンジオテンシンIIの濃度〔log (mol/L) 〕を、縦軸はアンジオテンシンII刺激をしない場合の活性を1としたときの活性比を表す。

第15図 宿主細胞株GBCRC6にpAGal9-B1を導入した安定形質転換株を、 17β -エストラジオールによりB1遺伝子発現誘導後、各種濃度のDes-Arg9-ブラジキニンで刺激したときのウミシイタケ・ルシフェラーゼ活性を示す。横軸はDes-Arg9-ブラジキニンの濃度〔log (mol/L) 〕を、縦軸はDes-Arg9-ブラジキニン刺激をしない場合の活性を1としたときの活性比を表す。

第16図 宿主細胞株GBCRC6にpAGal9-sst5を導入した安定形質転換株を、 17β -エストラジオールによりsst5遺伝子発現誘導後、各種濃度のソマトスタチンで刺激したときのウミシイタケ・ルシフェラーゼ活性を示す。横軸はソマトスタチンの濃度〔log (mol/L) 〕を、縦軸はソマトスタチン刺激をしない場合の活性を1としたときの活性比を表す。

第17図 宿主細胞株GBCRC2にpAGal9-MC1Rを導入した安定形質転換株を、 17β -エストラジオールによりMC1R遺伝子発現誘導後、各種濃度のPAMPまたはPAMP-12で刺激したときのウミシイタケ・ルシフェラーゼ活性を示す。左側のグラフはPAMPで刺激した場合、右側のグラフはPAMP-12で刺激した場合を示す。横軸は左側のグラフはPAMPの濃度〔log (mol/L) 〕、右側はPAMP-12の濃度〔log (mol/L) 〕を、縦軸はそれぞれPAMPまたはPAMP-12刺激をしない場合の活性を1としたときの活性比を表す。

発明を実施するための最良の形態

〔実施例1〕 ラット胎児視床下部由来細胞株の樹立

Exp. Anim., 48, 255 (1999) に記載の方法で作製した温度感受性変異株SV40tsA58のラージT抗原遺伝子を導入したトランスジェニックラットの胎児（胎生14日、17日、および21日の胎児；各10～15匹）より視床下部を含む領域を摘出

した。視床下部を含む領域の摘出は既知の方法〔Endocrinology, 137, 5651 (1996)〕に準じて行った。トランスジェニックラットは、ワイエスニューテクノロジー研究所から入手した。

視床下部由来細胞の分離と回収は酵素法を用い、以下のように行った。摘出した視床下部をLeibovitz's L-15培地（ギブコ社製）で洗浄し、はさみで小さく刻んだ後に、800回転/分で5分間遠心分離した。遠心分離後、上清を除去し、5mlの0.25%トリプシン溶液（ギブコ社製）および10 μ g/mlのDNase I（ペーリンガー・マンハイム（Boehringer Mannheim）社製）を50 μ l加え、振とうしながら37°Cで10分間酵素処理した。倒立型顕微鏡下で該酵素処理の進行状態を確認した後、4°Cに冷却したウシ胎児血清を2ml添加してよく懸濁した。該懸濁液を800回転/分で5分間遠心分離し、細胞を回収した。

該細胞を、10mlのDMEM/F-12（FCS）培地〔10%ウシ胎児血清、50U/mlペニシリン、および50 μ g/mlストレプトマイシンを含む、DMEM培地とHam's F-12培地の等比率混合培地（ギブコ社製）〕に懸濁した。

該細胞懸濁液を、ポリ-リジンでコートされた100mmディッシュ（ベクトン・ディッキンソン社製）1枚にまき、33°C、炭酸ガス濃度5%、湿度100%の条件下で培養した。細胞が増殖して飽和した時点で、培養面に対する細胞密度が約70%になるように、ポリ-リジンでコートされた100mmディッシュに継代した。約3ヶ月間培養を継続し、視床下部由来の不活化細胞株の混合物を得た。取得した視床下部由来の不活化細胞株の混合物を、チューブを21本に約1 \times 10⁶個の細胞となるように分注し、公知の方法で凍結保存した。

細胞のシングルクローン化はコロニー形成法を用いて行った。ポリ-リジンでコートされた100mmディッシュに100個あるいは500個の細胞をまき、コロニーが形成されるまで培養した。培養後、顕微鏡下で観察しながらチップの先で各コロニーを剥がし、同時にチップ内に吸引して細胞を回収した。回収した各コロニー由来の細胞は、ポリ-リジンでコートされた24穴プレートにまき、培養した。細胞が増殖して飽和した時点で、6穴プレートおよび100mmディッシュ（いずれもポリ-リジンでコートされたもの）に順次スケールアップして、培養した。このようにして、最終的に4個のシングルクローン化した細胞株を取得した。該細胞株をそれぞれEA-1、EA-2、EA-4、EA-8と命名した。EA-1は胎生14日、EA-2とEA-4は胎生21日、

EA-8は胎生17日の胎児に由来する細胞株である。取得した4個の細胞株はそれぞれ公知の方法で凍結保存した。取得した細胞株のダブリングタイムは36～72時間であった。また、樹立後1年以上経過した後も、細胞株の増殖性に顕著な変化は見られなかった。

[実施例2] ラット新生児視床下部由来細胞株の樹立

実施例1と同様にして、温度感受性変異株SV40tsA58のラージT抗原遺伝子を導入したトランスジェニックラットの新生児（生後0日の新生児13匹）から視床下部を摘出し、得られた細胞を約3ヶ月間培養し、視床下部由来の不活化細胞株の混合物を得た。取得した視床下部由来の不活化細胞株の混合物を、チューブ20本に、約 1×10^6 個の細胞となるように分注し、公知の方法で凍結保存した。

該凍結保存株より、実施例1に記載の方法に準じて141個のシングルクローン化した細胞株を取得した。取得した141個の細胞株も上記同様凍結保存した。取得した細胞株のダブリングタイムは36～72時間であった。また、樹立後1年以上経過した後も、細胞株の増殖性に顕著な変化は見られなかった。

[実施例3] 成体ラット視床下部由来細胞株の樹立

温度感受性変異株SV40tsA58のラージT抗原遺伝子を導入したトランスジェニックラットの成体（生後8週齢：雄1匹、雌2匹）を頸椎脱臼により致死させた後、脳を摘出した。その脳を正中線で2等分し、髄膜を含まないように留意して視床下部を摘出した。視床下部の摘出は以下のように行った。

ラットを断頭後、頭蓋骨を露出させるために、頭部より皮膚ならびに筋肉を丁寧に除去した。断頭部より正中線に沿って頭蓋骨にはさみをいれて切断した後、最初の切断面と直角にはさみをいれることで、頭蓋骨上部を除去し、脳を露出させた。脳底に慎重にはさみをいれ視交叉を切除し、脳を頭蓋骨から取り出した。取り出した脳は腹側を上にし、「カラーアトラス ラットの解剖ガイドブック」（廣川書店）の52頁の図を参考にして、脳底中心部にある下垂体を同定した。本下垂体を指標にして、The Rat Brain in Stereotaxic Coordinate, Second Edition, Academic Press (1986)の図を参考に、視床下部領域を摘出した。

実施例1と同様にして、摘出した雄または雌の視床下部由来の細胞を別々に約3

ヶ月間培養し、不死化した視床下部由来細胞株の混合物を得た。取得した成体雄または雌の視床下部由来の不死化細胞株の混合物を、それぞれチューブ11本に、約 1×10^6 個の細胞となるように分注し、公知の方法で凍結保存した。

該成体雄の視床下部由来の不死化細胞株の混合物より、実施例1に記載の方法に準じて、373個のシングルクローン化した細胞株を取得した。取得した373個の細胞株をそれぞれ公知の方法で凍結保存した。取得した細胞株のダブリングタイムは36～72時間であった。また、樹立後1年以上経過した後も、細胞株の増殖性に顕著な変化は見られなかった。

同様に、成体雌の視床下部由来の不死化細胞株の混合物より280個のシングルクローン化した細胞株を取得した。取得した280個の細胞株をそれぞれ公知の方法で凍結保存した。取得した細胞株のダブリングタイムは36～72時間であった。また、樹立後1年以上経過した後も、細胞株の増殖性に顕著な変化は見られなかった。

〔実施例4〕 視床下部由来細胞株におけるSV40ラージT抗原の発現解析

実施例1～3で取得したラットの胎児、新生児、成体雄、および成体雌の視床下部由来の不死化細胞株の混合物に対して、免疫染色法を用いてSV40ラージT抗原の蛋白質レベルでの発現を検討した。

上記の各不死化細胞株の混合物を用いて、実施例1に記載の方法に準じて培養した後、培地を除き、4%パラフォルムアルデヒド溶液を加え、4℃で10分間反応させ細胞を固定した。該固定化細胞を0.3% トリトンX-100溶液で処理した後、10倍希釈したSV40ラージT抗原に対する抗体〔オンコジーン (ONCOGENE) 社製〕を添加し、37℃で60分間反応させた。反応後、PBSで1回洗浄し、40倍希釈したFITC標識抗マウスIgG (KPL社製) を添加し、室温で60分間反応させた。反応後、PBSで1回洗浄し、1 μ g/mlのヘキスト33342溶液〔CALBIOCHEM (カルビオケム) 社製〕を添加し、室温で5分間反応させて核を染色した。

該核染色細胞をPBSで1回洗浄した後、乾燥させ、退色防止剤を含む溶液〔90%グリセロールおよび2.5%1,4-ジアザビスクロ-[2,2,2]-オクタン (DABCO) を含むPBS、以下「退色防止剤溶液」とよぶ〕でマウントし、蛍光顕微鏡下で観察した。第1図に示したように、ほとんどの細胞においてSV40ラージT抗原の発現を示す陽

性の染色が確認された。

以上の結果より、実施例1～3で取得したラットの胎児、新生児、成体雄、および成体雌の視床下部由来の不死化細胞株は、SV40ラージT抗原が発現されることにより不死化したものと考えられた。

さらに、39℃培養条件下で同様に染色を行ったところ、33℃培養条件下と比較して明らかにシグナルの低下が認められた。結果を第2図に示した。この結果より、取得した細胞群は温度感受性のSV40ラージT抗原を発現していると考えられた。

〔実施例5〕 視床下部由来細胞株の培養法の検討

実施例1～3で取得したラットの胎児、新生児、成体雄、および成体雌の視床下部由来の不死化細胞株を用い、細胞の形態を指標として、細胞の分化形質に及ぼす培養法の影響を検討した。

(1) 培養温度の検討

上記の各不死化細胞株（シングルクローンおよび混合物）を、実施例1に記載した方法に準じて培養した。培養後、約 2×10^4 個の細胞をポリ-リジンでコートされた35mmディッシュにまき、33℃、37℃または39℃で5日間培養し、その形態を顕微鏡で観察した。

その結果、37℃または39℃で培養することにより細胞の形態が変化し、神経細胞、オリゴデンドロサイト、またはアストロサイトに特徴的な形態を示す細胞が出現した。この結果は、37℃または39℃で培養することにより、上記視床下部由来不死化細胞株を分化させることが可能なことを示している。実施例3で取得した成体雄の視床下部由来の不死化細胞株（AMN2-100）を用いて行った実験結果を第3図に示した。

(2) 培地の検討

上記の各不死化細胞株（シングルクローンおよび混合物）を、実施例1に記載した方法に準じて培養した。培養後、約 2×10^4 個の細胞をポリ-リジンでコートされた35mmディッシュにまき、DMEM/F-12（FCS）培地、DMEM/F-12（N2）培地〔DMEM/F-12（FCS）培地の10%ウシ胎児血清の代わりに1%のN-2サプリメント（ギブコ社製）を添加した培地〕、または血清成分を添加しないDMEM/F-12（FCS）培地〔以下DMEM/F-12（-FCS）培地と呼ぶ〕で5日間培養し、その形態を顕微鏡で観

察した。

その結果、DMEM/F-12 (N2) 培地またはDMEM/F-12 (-FCS) 培地で培養することにより細胞の形態が変化し、神経細胞、オリゴデンドロサイト、またはアストロサイトに特徴的な形態を示す細胞が出現した。この結果は、DMEM/F-12 (N2) 培地またはDMEM/F-12 (-FCS) 培地のような血清を含まない培地で培養することにより、上記視床下部由来不死化細胞株を分化させることが可能なことを示している。実施例3で取得した成体雄の視床下部由来の不死化細胞株 (AMF2-20) を用いて行った実験結果を第4図に示した。

(3) 培養温度と培地の検討

上記の各不死化細胞株 (シングルクローンおよび混合物) を、実施例1に記載した方法に準じて培養した。培養後、約 2×10^4 個の細胞をポリ-リジンでコートされた35mmディッシュにまき、下記の2条件で培養後、その形態を顕微鏡で観察した。条件1は33°Cで8日間、条件2は37°Cで5日間培養後、DMEM/F-12 (-FCS) 培地に交換してさらに3日間培養する条件である。

その結果、条件2では細胞の形態が変化し、神経細胞、オリゴデンドロサイト、またはアストロサイトに特徴的な形態を示す細胞が出現した。この結果は、条件2で培養することにより、上記視床下部由来不死化細胞株を分化させることが可能なことを示している。

[実施例6] 視床下部由来細胞株における各種遺伝子の発現解析

実施例1〜3で取得した細胞株の、第1表に示した視床下部細胞で発現している各種遺伝子に関する発現状況を下記方法により解析した。

実施例1で取得したラット胎児由来細胞株4種、実施例2で取得したラット新生児由来細胞株57種、実施例3で取得したラット成体雄由来細胞株49種、および実施例3で取得したラット成体雌由来細胞株46種を、実施例1に記載した方法に準じて培養した。培養後、約 1×10^5 個の細胞をポリ-リジンでコートされた100mmディッシュにまき、培養温度を33°Cから37°Cにシフトして5日間培養した。

培養後、各細胞株からRNeasy Mini Kit [キアゲン (QIAGEN) 社製] を用いて全RNAを取得した。該全RNAを5 μ g用い、SUPERScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (ギブコ社製) により一本鎖cDNAを合成した。該一本鎖cDNAを

水で50倍希釈し、PCRの鋳型として使用した。

該一本鎖cDNA (5 μ l) に、第1表に示した遺伝子特異的プライマー (各20pmol)、2.5mmol/L dNTP混合液を1.6 μ l、DMSOを1 μ l、5単位/ μ lのRecombinant Ex Taq DNA Polymerase (宝酒造社製) を0.1 μ l、10 \times 反応緩衝液 (宝酒造社製) を2 μ l 添加し、滅菌水を加えて全量を20 μ lに調製した。該調製液を用い、下記条件でPCRを行った。サーマルサイクラーDNA Engine (MJ Research社製) を用い、95 $^{\circ}$ C5分間の熱処理後、94 $^{\circ}$ Cで1分間、55、60、65あるいは67 $^{\circ}$ C (各遺伝子増幅に対応する反応温度を第1表に示した) で1分間、72 $^{\circ}$ Cで1分間からなる反応を25~35サイクル行った。

第1表

No.	遺伝子	プライマー (配列番号)	反応温度 ($^{\circ}$ C)
1	レプチン受容体 (Ob-Rb)	1, 2	55
2	プレプロニューロメディンU	3, 4	65
3	RFRPプレプロ蛋白質	5, 6	65
4	プレプロオレキシン	7, 8	65
5	プレプロオピオメランコルチン	9, 10	65
6	プレプロニューロペプチドY	11, 12	60
7	プレプロニューロペプチドFF	13, 14	65
8	プレプロコルチコトロピン放出ホルモン	15, 16	65
9	プレプロサイトロトロピン放出ホルモン	17, 18	65
10	プレプログレリン	19, 20	65
11	プレプロメラニン凝集ホルモン	21, 22	60
12	CART	23, 24	60
13	2型ニューロメディンU受容体	25, 26	65
14	RFRP受容体	27, 28	65
15	4型メラノコルチン受容体 (MC4R)	29, 30	60
16	1型ニューロペプチドY受容体 (NPY1R)	31, 32	60
17	5型ニューロペプチドY受容体 (NPY5R)	33, 34	60
18	2型ニューロペプチドFF受容体 (NPFF2)	35, 36	55
19	1型コルチコトロピン放出ホルモン受容体 (CRHR-1)	37, 38	60
20	2型コルチコトロピン放出ホルモン受容体 (CRHR-2)	39, 40	60
21	グレリン受容体	41, 42	67
22	1型メラニン凝集ホルモン受容体 (MCHR1)	43, 44	65

該反応液の一部 (8 μ l) をアガロースゲル電気泳動に供した後、ゲルをSYBR Green I nucleic acid stain [モレキュラー・プローブズ (Molecular Probes) 社] で染色した。増幅されたDNA断片のパターンをフルオロイメジャー [FluorImager SI; モレキュラー・ダイナミックス (Molecular Dynamics) 社製] で解析することにより、増幅されたDNA断片の量を測定した。

各遺伝子の転写産物の定量は、常法 [PCR Protocols, Academic Press (1990)] にしたがって半定量的PCR法により行った。ラット・グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ (以下、G3PDHと略す) の転写産物を同時に定量することにより、細胞間でのmRNA量の違いや、サンプル間での逆転写酵素によるmRNAから一本鎖cDNAへの変換効率に大差ないことを確認した。G3PDH転写産物の定量は、常法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 2725 (1990); J. Biol. Chem., 269, 14730 (1994); 特開平06-181759] にしたがって定量的PCR法により行った。

解析結果を第2表～第5-2表に示した。上記の(1)～(22)の遺伝子の発現パターンが異なる多様な細胞株が取得されていることが明らかになった。

第2表 ラット胎児視床下部由来細胞株の遺伝子発現

遺伝子 細胞株	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
EA-1	++	+++			-	+		+/-	++			-	-	-	++	++	++	-				
EA-2	+			-	-	++		+/-	+		-	+/-			+/-	+	-					++
EA-4	+++			-	+/-	+		+/-	+/-		-	-			++	+	+/-					+
EA-8	-			-	-	++		+/-	+		-	+			++	+	-					+++

各遺伝子の発現量を、+++, ++, +, +/-, -で示した。空欄は発現量未測定。

細胞株：実施例1で取得された胎児の視床下部由来の細胞株

遺伝子：第1表に記載の遺伝子に対応

第 3-1 表 ラット新生児視床下部由来細胞株の遺伝子発現 (1)

遺伝子 細胞株	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
Na-2	++	++			-	++		+/-	+			-	-	+/-	+	++	++	-				
Na-3	++	++			-	+++		+	++			-	+/-	++	++	++	+/-	+/-				
Na-4	+	++			-	++		-	++			-	++	+/-	+	+	+/-	-				
Na-5	+++			-	-	++		-	+++		-	-			++	+	-					+
Na-6	++	++			-	+++		-	+++		-	-	+++	++	++	++	+/-	-				
Na-7	+++	++			-	++		+++	+++		-	-	++	+++	+++	+++	+++	-				
Na-8	++			-	-	++		-	++		-	-			++	+	-					+
Na-10	++	++			-	+++		+/-	++		-	-	+/-	++	++	++	+/-	-				
Na-11	++	+++			-	+++		+++	+++		-	-	+++	+++	+++	+++	+++	-				
Na-13	+++			-	-	+++		+/-	+++		-	-			+++	++	++					+
Na-15	+	+++			-	+++		-	+		-	-	++	+	+	+	-					
NA-6	++	+++			-	+/-		+/-	++		-	-	-	+++	++	++	+/-	-				
NA-7	+++	+++			-	+++		+/-	++		-	-	-	+++	++	+	-					
NB-1	+			-	-	+++		-	+/-		-	-			++	++	++					+++
NB-2	+			-	-	+/-		+/-	+		-	-			++	++	-					+
NB-3	+++			-	-	+/-		-	+		-	-			++	+	-					++
NB-4	+			-	-	+/-		-	+		-	-			++	++	+/-					++
NB-5	+			-	-	+++		-	+		-	-			++	+	-					++
NB-6	++			-	-	+/-		+/-	+++		-	-			++	+	-					+
NC-1	++			-	-	+/-		+/-	+/-		-	-			++	+	+/-					+
NC-2	++++			-	-	+/-		+	++		-	-			-	++	++					++
NC-3	++			-	-	+		-	-		-	-			+	+	-					+/-
NC-4	+++			-	-	+		-	+		-	+			+/-	+	-					+
NC-5	++			-	+/-	+/-		-	+		-	-			++	++	+/-					++
NC-6	++			-	-	+++		-	+		-	-			++	+	+/-					+
NC-7	++			-	-	+++		-	+		-	+			++	++	-					+
NC-8	-			-	-	+/-		+	++		-	-			+++	++	++					+++
NC-9	+			-	+/-	+/-		+/-	++		-	-			+++	++	+					+++
NC-10	+/-			-	+/-	+		+	++		-	-			++	++	+					+++

各遺伝子の発現量を、+++、++、+、+/-、-で示した。空欄は発現量未測定。

細胞株：実施例 2 で取得された新生児の視床下部由来の細胞株

遺伝子：第 1 表に記載の遺伝子に対応

第3-2表 ラット新生児視床下部由来細胞株の遺伝子発現 (2)

遺伝子 細胞株	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
NC-11	+++			-	-	+		+	++		-	-			++	+++	++					+++
NC-12	++			-	+	+/-		+/-	++		-	+			++	++	++					+++
NC-13	+			-	-	+		+	++		-	-			++	+++	++					+++
NC-14	+++			-	-	-		-	+		-	-			+	+/-	+/-					+
NC-15	+			-	-	+/-		-	+/-		-	-			+	+/-	-					+
NC-16	+			-	-	+++		-	+		-	-			+	+	-					++
NC-17	+++			-	-	+		+/-	+		-	-			+++	++	+					+
NC-18	++			-	-	+		-	+/-		-	-			+	-	-					+
NC-19	+/-			-	-	+/-		-	+		-	-			+	+/-	-					+
NC-20	++			-	-	+		+/-	++		-	+/-			++	+/-	+					+++
NC-21	++			-	-	++		-	+		-	+/-			+	+/-	+/-					+
NC-22	+			-	-	+		-	+		-	-			+	+/-	-					++
NC-23	+	++		-	-	+++		+/-	++		-	-	+	+	++	++	+/-	-				
NC-24	+			-	-	++		-	+/-		-	+/-			+	+/-	-					+
NC-25	+++			-	-	+/-		-	+		-	+			+/-	+	++					+
ND-1	+			-	-	++		+/-	+		-	-			+++	+	+					+
ND-2	+++			-	-	+		-	+/-		-	-			+/-	++	+/-					+
ND-3	+			-	-	+		-	+/-		-	-			+	+	+/-					+
ND-4	++			-	-	+/-		-	+/-		-	+/-			-	+	-					+
ND-5	++			-	-	+		-	++		-	-			++	+	-					+
ND-6	+/-	++		-	-	+		+++	+++		-	-	-		+++	+++	+++	-				
ND-7	+/-	-		-	-	+		+++	+++		-	-	-		+++	+++	+++	-				
ND-8	+/-	+		-	-	+		+++	+++		-	-	-		+++	+++	+++	-				
ND-9	+/-	-		-	-	+		+++	+++		-	-	-		+++	+++	+++	-				
ND-10	+/-	++		-	-	+		+/-	++		-	-	-		++	+	+/-	-				
ND-11	+	-		-	-	++		+/-	+		-	-	+/-	++	++	+/-	-					
ND-12	+++	+		-	-	++		+/-	+		-	-	+	++	++	+/-	-					
ND-13	+++	++		-	-	+		+/-	+		-	-	++	+	+	+/-	-					

各遺伝子の発現量を、+++、++、+、+/-、-で示した。空欄は発現量未測定。

細胞株：実施例2で取得された新生児の視床下部由来の細胞株

遺伝子：第1表に記載の遺伝子に対応

第 4-1 表 ラット成体雄視床下部由来細胞株の遺伝子発現 (1)

細胞株 \ 遺伝子	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
AMF1-1	+		-	-	-	+/-	+	+++	+++	-	-	-			+++	++	+++		-	-	+++	
AMF1-7	++		-	-	-	+/-	++	++	+++	+/-	-	-	-	-	+++	+++	++	-	-	+++	+++	+++
AMF1-13	+		+/-	+	+	+	+++	+/-	+	+	-	+	-	++	++	+	++	-	-	-	++	++
AMF1-14	+		-	-	-	+	+	+	++	+/-	-	-	-	+	+	+	+/-	-	-	-	+/-	+++
AMF1-15	++			-	-	++	+	++	+++	+++	-	-			++	++	++		-	-	+	
AMF1-21	-		+/-	-	-	+/-	++	+++	+++	-	-	++			+++	++	+++		-	+	+++	
AMF1-25	++		-	-	-	-	+	+/-	++	-	-	-			++	+/-	+		-	-	+	
AMF1-26	+/-			-	-	+/-	+/-	++	+	+/-	-	+/-			+++	++	++		-	+/-	+++	
AMF1-32	++			-	-	++	+	+/-	+/-	-	-	-			+	+	+		-	+	++	
AMF1-36	+			-	-	-	+	+	+	-	-	-			++	+	+		-	-	++	
AMF1-39	+			-	-	-	+	+	+/-	-	-	+/-			+	+	+		-	-	++	
AMF1-44	+		-	-	-	++	++	+	++	++	-	-	-		++	+	+	+++	-	-	++	++
AMF1-48	+/-		+/-	+	-	+/-	-	+/-	+	+	-	-	-	+	+/-	-	-	-	-	-	++	++
AMF1-54	+/-		-	-	-	+/-	+	+/-	+	-	-	-	-	++	++	-	-	-	-	-	+	+
AMF2-2	+/-		+	-	-	+	+	+/-	+	+	-	-	-	+	++	+/-	+/-	-	-	-	++	+++
AMF2-14	++		+/-	-	-	+++	+++	++	+++	+/-	-	+			++	++	+		-	+	++	
AMF2-19	++		+/-	-	+/-	++	++	+	+++	+/-	-	-			++	++	+++		-	-	++	
AMF2-20	+++		+/-	-	+	++	+	+	+	-	-	+	-	+++	++	++	+	-	-	-	+	++
AMF2-45	+/-		+++	-	-	+	++	+	++	-	-	-	-	+	+++	+++	++	-	-	-	+	+
AMF2-49	++		-	-	-	++	++	+	++	++	+	-			+	++	++		-	+++	++	
AMF2-52	++		++	-	-	+++	+++++	+	+++	+/-	-	+/-			++	++	++		-	++	++	
AMF2-57	+		-	-	-	+	+	+/-	+	-	-	-			++	+	+		-	-	+	
AMF2-61	+		+/-	-	-	+/-	+	+/-	+	-	-	+	-	+/-	++	++	+	-	-	+	+	+
AMF2-62	+		+/-	-	+/-	+/-	+++	+/-	+	++	-	-	-	+	++	+	+	-	-	+/-	+	++
AMF2-64	+/-		+/-	-	-	+++	+/-	++	+++	-	-	-			+++	+++	+++		-	-	+++	

各遺伝子の発現量を、+++、++、+、+/-、-で示した。空欄は発現量未測定。

細胞株：実施例 3 で取得された成体雄の視床下部由来の細胞株

遺伝子：第 1 表に記載の遺伝子に対応

第4-2表 ラット成体雄視床下部由来細胞株の遺伝子発現 (2)

細胞株 \ 遺伝子	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
AMN1-4	+		-	-	-	+	++	++	+++	-	-	-	-	+++	++	+	++	-	-	-	+++	+++
AMN1-5	+			-	-	+	+	+	+/-	-	-	-			+	+	+		-	+/-	+	
AMN1-15	+		+/-	+	-	+	+++	+	++	+	-	-	-	+++	+++	++	+++	-	-	+/-	+++	+++
AMN1-29	+		-	-	-	+/-	+	++	+	-	-	++			++	++	++		-	-	++	
AMN1-33	++		-	-	-	+++	+++	+/-	+	-	-	+	-	+	++	+++	+/-	-	-	-	++	+
AMN1-35	++		+/-	-	+/-	+	++	+	+	-	-	-			+	++	++		++	++	+++	
AMN1-39	+		++	+	+/-	+	+++	+/-	+	-	-	-	-	+	+	+	+/-	-	-	-	+	+
AMN1-41	+			-	-	+/-	+/-	-	+	-	-	-			++	+	+		-	+/-	+	
AMN1-42	+		-	-	-	-	+	+/-	+	++	-	-	-	+	+/-	+/-	-	-	-	-	+	+++
AMN1-50	+++		+/-	+	+/-	+++	+++	+/-	+	+	-	+	-	-	++	+++	+/-	-	+	-	++	+
AMN1-52	++			-	-	+	++	+/-	++	+/-	-	+/-			+	+	+		-	-	+	
AMN1-61	++			-	-	+/-	+	+/-	+	-	-	-			++	+	+		-	+	+	
AMN1-70	+++		-	-	-	+	+	+/-	+	++	-	-	-	+	+	+/-	-	-	-	-	++	+
AMN1-71	+++		++	-	-	+	+++	+/-	+	+	-	+/-			+	+/-	+		-	++	++	
AMN1-285	+++			-	-	+	+	+	+/-	-	-	-			+	+	+		-	-	+	
AMN2-1	+	++			-	++		++	++			-	-	-	++	+++	++	-				
AMN2-13	+	+			-	++		++	++			-	-	+/-	++	+++	+	-				
AMN2-14	++		-	-	-	+	+	+/-	+	-	-	-			+	+	+		+	-	+/-	
AMN2-23	+		-	-	-	+	+	+/-	+	-	-	-			++	+	+		-	-	+	
AMN2-25	+		+++	-	-	+++	+++	+	++	+++	-	-	-		++	+	++	-	-	-	+++	++
AMN2-59	+		+/-	-	-	++	+	++	++	-	-	+	-	+++	+++	+++	+++	-	-	-	+	+/-
AMN2-72	+++		+++	+	-	+	+	+	++	-	-	+	-	+	++	+	+	-	-	-	+	+++
AMN2-88	+		+/-	-	+/-	+/-	+	+/-	+	-	-	-	-	+	+	++	+/-	+/-	-	-	+	+
AMN2-100	++		+++	-	+/-	+++	+++	+/-	+	+	-	++	+/-	+	++	+++	+/-	+/-	+	-	+	+
AMN2-332	+		+/-	-	-	++	+	+	++	-	-	+	-	++	++	++	++	-	-	-	++	+++

各遺伝子の発現量を、+++、++、+、+/-、-で示した。空欄は発現量未測定。

細胞株：実施例3で取得された成体雄の視床下部由来の細胞株

遺伝子：第1表に記載の遺伝子に対応

第5-1表 ラット成体雌視床下部由来細胞株の遺伝子発現 (1)

遺伝子 細胞株	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
AFF1-19	++		+++	-	-	+	+	+/-	+	-	-	-	-	-	+/-	+	+/-	+++	-	-	+/-	+
AFF1-21	+		+++	+	-	++	++	+/-	+	+/-	-	-	-	-	+	+	+/-	-	++	-	+/-	++
AFF1-35	++		+++	-	-	++	+	-	+	-	-	-	-	-	+/-	++	-	-	-	-	+/-	++
AFF1-37	+++		+	+	-	+++	+	+/-	+	++	-	+/-			+	+	+		-	-	+/-	
AFF1-39	++		+++	+	-	+++	+	+/-	+	+/-	-	-			+	+	+		++	-	+/-	
AFF1-53	++		+++	-	-	++	++	+/-	+	++	-	-			+	+	+		-	++	+/-	
AFF1-54	+++		+/-	-	-	++	++	+	+	++	-	+/-			++	+	++		-	+++	+	
AFF1-57	+++		+++	-	-	+++	++	+/-	+	+/-	-	+	-	-	+/-	++	+/-	-	-	-	+/-	+/-
AFF1-59	+++		+++	-	-	+	+	-	+	+/-	-	-	-	-	+/-	+	-	+	-	-	+/-	+/-
AFF2-7	+		-	-	-	+/-	+	+++	+++	+/-	-	-			+++	+++	+++		-	-	++	
AFF2-11	+		+++	-	-	+/-	++	+++	+++	-	-	-			+++	+++	++		-	-	++	
AFF2-19	+/-		+/-	-	-	+/-	+++	+++	+++	+/-	-	-	-	-	+++	+++	++++		-	-	+++	+++
AFF2-25	++		++	-	-	+++	+++	+++	+++	+/-	-	-	-		+++	+++	+++		-	-	+++	
AFF2-30	-		-	-	-	++	+/-	+++	+++	+/-	-	-			+++	+++	+++		-	-	+++	
AFF2-32	+		+/-	-	-	-	+/-	+	+	-	-	-			++	++	+		-	-	+	
AFF2-32	+/-	-			-	+		-	+		-	-	-		++	++	++	-				
AFF2-34	+++		+++	-	+/-	++	+++	++	+	-	-	+			+++	++	++		-	+/-	++	
AFF2-35	++		+++	-	-	+	+++	+++	+++	+	-	-			+++	++	+++		-	+/-	+++	
AFF2-36	++		+/-	-	-	++	++	+/-	++	+	-	-			+	+	+		-	+/-	+/-	
AFF2-43	-		+/-	-	-	-	+/-	+++	+++	-	-	-			+++	+++	+++		+/-	-	+++	
AFF2-45	+		+	-	-	+	+	+++	+++	-	-	-			+++	+++	+++		-	-	+++	
AFF2-46	+/-	-			-	+		+++	++		-	-	-		+++	+++	+++	-				
AFF2-52	+/-		-	-	-	-	+	+++	+++	-	-	-			+++	+++	+++		++	-	+++	
AFF2-55	+/-	-			-	+		++	++		-	-	-		+++	+++	+++	-				
AFF2-402	+++		+/-	-	-	+/-	+++	+/-	+	-	-	-	-	++	++	++	+/-	-	-	-	++	+
AFF2-403	++		++	-	+	+/-	+++	+	++	+/-	-	++	-	+	++	++	+/-	-	+	-	+	++

各遺伝子の発現量を、+++、++、+、+/-、-で示した。空欄は発現量未測定。

細胞株：実施例3で取得された成体雌の視床下部由来の細胞株

遺伝子：第1表に記載の遺伝子に対応

第 5-2 表 ラット成体雌視床下部由来細胞株の遺伝子発現 (2)

遺伝子 細胞株	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
AFN1-16	++		+/-	-	-	+/-	+	+++	+++	-	-	-			++	+++	++		-	-	+++	
AFN1-22	+		++	-	-	++	+++	-	+	-	-	-	-		+/-	+	-	-	-	-	+/-	+
AFN1-34	+		+	-	+/-	+++	+++	+++	++	+++	-	-	-	++	+	++	++	++	-	-	++	+++
AFN1-40	++		+	-	+/-	+	+++	++	+++	++	-	-	-	+++	++	++	+/-	-	-	-	++	+++
AFN1-54	+++		+	-	+/-	+++	+++	+	++	-	-	-	-	+++	+	++	+	-	-	-	++	++
AFN1-64	++		++	-	-	+/-	++	+/-	+	-	-	++	-	++	+/-	+/-	-	-	-	-	+/-	+/-
AFN1-394	++		+++	-	+/-	+++	++	+	+	++	-	+			++	++	++		++	+/-	+++	
AFN1-408	++		++	-	+	+++	+++	+++	++	+/-	-	-	-	++	+++	+++	+++	-	+	++	+++	+++
AFN1-411	+++		+	+	+	+++	+++	+/-	+	+/-	-	-	-	++	+	++	+/-	-	++	-	++	+
AFN2-4	+/-		+	-	-	++	++	+++	+++	+/-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	-	-	-	+++	+++
AFN2-5	+	+/-			-	+		+	+			-	-	-	++	++	++	-				
AFN2-10	+	-			-	++		++	+			-	-	-	++	+++	+	-				
AFN2-16	-		+/-	-	-	-	+/-	++	+	-	-	-			++	++	++		-	-	++	
AFN2-18	+/-		++	-	+	+/-	++	++	++	-	-	++	-	+	+++	+++	+++	-	-	-	++	+
AFN2-26	+/-		+++	-	-	+	+/-	+++	+++	-	-	-			+++	++	+		+/-	-	+++	
AFN2-29	+		+++	-	-	+	+	+++	+++	-	-	-			+++	++	++		-	-	+++	
AFN2-34	+/-		+/-	-	-	+	+++	++	+++	+/-	-	-	-	+++	+	+	+/-	-	-	-	+	+++
AFN2-41	++		++	-	-	+++	+++	++	+++	+++	-	-			++	++	++		+++	++	++	
AFN2-402	++		+/-	-	-	+/-	++	+/-	+	-	-	+	-	+	+	+	+/-	-	-	-	+	+

各遺伝子の発現量を、+++、++、+、+/-、-で示した。空欄は発現量未測定。

細胞株：実施例 3 で取得された成体雌の視床下部由来の細胞株

遺伝子：第 1 表に記載の遺伝子に対応

視床下部の弓状核、室傍核、外側野、腹内側核、背内側核に発現しているレプチン受容体 (Ob-Rb) 遺伝子は多くの細胞株で発現されていた。弓状核、室傍核、外側野、腹内側核、背内側核に存在する Ob-Rb 発現細胞は、それぞれ別の機能を有していると考えられており、上記(1)～(22)の遺伝子の発現は細胞株によって異なることから、異なる多種の Ob-Rb 遺伝子発現細胞株を取得することができた。

核に特徴的な遺伝子の発現を指標に、上記のOb-Rb発現細胞株がどの核由来のどのような細胞かを下記のように推定することが可能である。また、Ob-Rbを発現していない細胞株についても、同様にしてどの核由来の細胞かを推定することができる。

AMN2-25は、Ob-Rb遺伝子、プレプロニューロペプチドY遺伝子、プレプログレリン遺伝子、MC4R遺伝子、NPY1R遺伝子、NPY5R遺伝子、グレリン受容体遺伝子等を発現していることから、弓状核由来のNPY産生細胞であると推定される。

NC-12は、Ob-Rb遺伝子、プレプロオビオメラノコルチン遺伝子、CART遺伝子、MC4R遺伝子、NPY1R遺伝子、NPY5R遺伝子等を発現していることから、弓状核由来の α -MSH産生細胞であると推定される。

AFN2-4、AFF2-19、AFF2-25は、プレプロコルチコトロピン放出ホルモン遺伝子およびプレプロサイトロピン放出ホルモン遺伝子を多く発現しており、かつMC4R遺伝子、NPY1R遺伝子、NPY5R遺伝子等も発現していることから、室傍核由来の細胞であると推定される。AFF2-25はOb-Rb遺伝子も発現していた。

AFF1-21、AFF1-37、AFF1-39、AFN1-411、AMF1-48、AMN2-72等プレプロオレキシン遺伝子を発現している細胞株、メラニン凝集ホルモン遺伝子を発現している細胞株（AMF2-14）あるいはNPFF2遺伝子を発現している細胞株（AFF1-19、AMF1-44）は、外側野由来の細胞であると推定される。

CRHR-1遺伝子またはCRHR-2遺伝子を発現している細胞株の中には、腹内側核または背内側核由来の細胞があると推定される。

[実施例7] 視床下部由来細胞株における各種遺伝子産物の発現解析

(1) Ob-Rbの発現解析

実施例6でOb-Rb遺伝子の発現が確認された視床下部由来の不死化細胞株について、下記免疫染色法により該遺伝子産物の発現を解析した。

実施例6でOb-Rb遺伝子の発現が確認された視床下部由来の不死化細胞株（混合物およびシングルクローンNC-6、NC-12およびAMN2-25）を、実施例1に記載の方法に準じて培養した。培養後、約 1×10^3 個の細胞をCELL-TAK〔コラボレーティブ・バイオメディカル・プロダクツ（Collaborative Biomedical Products）社製〕でコートされた8チャンバーにまき、培養温度を33℃から37℃にシフトして5日間培

養した。

培養後、培地を除き4%パラフォルムアルデヒド溶液を加え、4℃で10分間反応させ、細胞を固定した。該固定化細胞を0.3%トリトンX-100溶液で処理した後、20倍希釈したOb-Rbに対する抗体〔サンタ・クルズ (Santa Cruz) 社製〕を添加し、37℃で60分間反応させた。コントロールとしては、Ob-Rbに対する抗体の代わりに正常ヤギ血清を用いた。反応後、PBSで1回洗浄し、200倍希釈したAlexa488標識抗ヤギIgG (モレキュラー・プローブズ社製) を添加し、室温で60分間反応させた。反応後、PBSで1回洗浄し、1 μ g/mlのヘキスト33342溶液 (カルビオケム社製) を添加し、室温で5分間反応させて核を染色した。染色後、PBSで1回洗浄し、乾燥させ、退色防止剤溶液でマウントし、蛍光顕微鏡下で観察した。

その結果、混合物およびシングルクローンNC-6、NC-12およびAMN2-25のいずれにおいても、Ob-Rbの発現を示す陽性の染色が確認された。成体雌の視床下部由来不死化細胞株 (混合物) の結果を第5図に示した。

(2) ニューロペプチドYの発現解析

また、実施例6でプレプロニューロペプチドY (プレプロNPY) 遺伝子の発現が確認された視床下部由来の不死化細胞株 (混合物またはシングルクローン) に関しても同様に、Ob-Rbに対する抗体の代わりに200倍希釈したNPYに対する抗体〔ケミコン・インターナショナル (CHEMICON International) 社製〕および200倍希釈したシアニン3標識抗ヤギIgG〔ジャクソン (Jackson) 社製〕を用いて解析した。

プレプロNPY遺伝子の発現が確認された視床下部由来の不死化細胞株は、NPYの発現を示す陽性の染色が確認された。成体雄の視床下部由来不死化細胞株AMN2-25の結果を第6図に示した。同様の免疫染色法により、実施例6で発現の確認された遺伝子が、蛋白質レベルでも発現されていることを確認することができる。

〔実施例8〕 視床下部由来レプチン受容体発現細胞株におけるレプチン反応性の検討

(1) 抗STAT抗体を用いた免疫染色による解析

実施例7に記載の方法でレプチン受容体 (Ob-Rb) 蛋白質を発現していることの確認された細胞株において、機能的なOb-Rbが発現しているかどうかを下記方法で解析した。下記方法は、レプチン刺激により転写因子STAT3がリン酸化され、細胞

質から核へ移行することを利用した方法である。

レプチン受容体 (Ob-Rb) 蛋白質を発現しているNC-6、NC-12およびAMN2-25を、実施例1に記載の方法に準じて培養した。培養後、約 1×10^3 個の細胞をCELL-TAKでコートされた8チャンバーにまき、培養温度を33°Cから37°Cにシフトして3日間培養した。培養後、培地を除き、DMEM/F-12 (-FCS) 培地に交換して37°Cで17時間培養した。培養後、DMEM/F-12 (-FCS) 培地に交換した。培地交換2時間後に100nmol/Lのヒト・レプチン (R & Dシステム社製) で37°C、15分間細胞を刺激した。

刺激後、抗STAT抗体 (NEB社製)、および200倍希釈したシアニン3標識抗ラビットIgG (2次抗体) を用いて免疫染色を行った。免疫染色はPhosphoPlus Stat3(Tyr705)Antibody Kit (NEB社) のマニュアルに準じて行った。また、1 μ g/ml溶液のヘキスト33342 (カルビオケム社製) を添加し、室温で5分間反応させることにより核染色も行った。染色後、乾燥させ、退色防止剤溶液でマウントし、蛍光顕微鏡下で観察した。

Ob-Rb蛋白質を発現しているNC-6、NC-12およびAMN2-25は、レプチン刺激が無い条件では細胞質が染色されたが、レプチン刺激を行うことにより核内が染色された。この結果は、NC-6、NC-12およびAMN2-25は、機能的なOb-Rbを発現していることを示している。細胞株NC-12の結果を第7図に示した。

(2) c-fos遺伝子およびSOCS-3遺伝子の発現変動の解析

視床下部細胞においてレプチン刺激により発現が上昇することが知られているc-fos遺伝子およびSOCS-3遺伝子の発現を、PCR法利用した下記方法により解析することにより、上記(1)で機能的なOb-Rbを発現していることの確認された細胞株のレプチン反応性を、別の角度から確認した。

NC-6、NC-12およびAMN2-25を、実施例1に記載した方法に準じて培養した。培養後、約 2×10^4 個の細胞をポリ-リジンでコートされた35mmディッシュにまき、培養温度を33°Cから37°Cにシフトして5日間培養した。培養後、培地を除き、ウシ胎児血清を含まないDMEM/F-12 (-FCS) 培地に交換して37°Cで17時間培養した。培養後、DMEM/F-12 (-FCS) 培地に交換した。

培地交換2時間後に100nmol/Lのヒト・レプチン (R & Dシステム社製) を添加した。37°Cで0分間、30分間、または1時間培養後、各細胞株からRNeasy Mini

Kit(キアゲン社製)を用いて全RNAを取得した。実施例6に記載の方法に準じて、該全RNAから一本鎖cDNAを合成後、該cDNAを鋳型としてPCRを行った。c-fos遺伝子特異的プライマーとしては、配列番号45、46の塩基配列を有する合成DNAを、SOCS-3遺伝子遺伝子特異的プライマーとしては、配列番号47、48の塩基配列を有する合成DNAを用いた。G3PDH遺伝子の発現も合わせて検討した。

NC-6、NC-12およびAMN2-25のいずれも、G3PDH遺伝子の発現レベルに変化がないのに対し、c-fos遺伝子およびSOCS-3遺伝子はレプチン刺激により発現が上昇することが認められた。この結果も、NC-6、NC-12およびAMN2-25が、機能的なOB-Rbを発現していることを示している。またこの結果は、上記方法で機能的なOB-Rbを発現していることの確認された細胞株をレプチン刺激して発現が変動する遺伝子を探索することにより、レプチンに応答する遺伝子群を取得することが可能なことを示している。

[実施例9] 視床下部由来細胞株を宿主としたペプチド発現系の構築

(1) プレプロバソプレッシン遺伝子の発現プラスミドの造成

鋳型としてヒト胸腺由来のmRNA (1 μ G; クロンテック社製) から調製した一本鎖cDNAを、プレプロバソプレッシン遺伝子特異的プライマーとして、配列番号49および配列番号50に記載した配列を有する2種類の合成DNAを用い、PCRによりプレプロバソプレッシン遺伝子を取得した。上記プライマーには、それぞれHindIIIサイトおよびNotIサイトが導入されている。上記PCR増幅断片をHindIIIおよびNotIで切断後、HindIII-NotI断片を取得した。プラスミドpCDM8 (インビトロジェン社製) をHindIIIおよびNotIで切断後、HindIII-NotI断片を取得した。上記PCR増幅断片由来のHindIII-NotI断片およびpCDM8由来のHindIII-NotI断片を結合することにより、pCDM8-VPを造成した。

pCDM8-VPをHindIIIおよびNotIで切断後、プレプロバソプレッシン遺伝子を含むHindIII-NotI断片を取得した。該HindIII-NotI断片を、発現プラスミドpcDNA1/Amp (インビトロジェン社製) のHindIII-NotI間に組み込むことによりpcDNA1/Amp-VPを構築した。

また、該HindIII-NotI断片を、発現プラスミドpcDNA3.1(+) (インビトロジェン社製) のHindIII-NotI間に組み込むことによりpcDNA3.1-VPを構築した。

(2) プレプロコルチコトロピン放出ホルモン遺伝子の発現プラスミドの造成

鑄型としてヒト視床下部由来のmRNA (1 μ G; クロンテック社製) から調製した一本鎖cDNAを、プレプロコルチコトロピン放出ホルモン遺伝子特異的プライマーとして配列番号51および52に記載した配列を有する2種類の合成DNAを用い、PCRによりプレプロコルチコトロピン放出ホルモン遺伝子を取得した。上記プライマーには、それぞれHindIIIサイトおよびNotIサイトが導入されている。上記PCR増幅断片をHindIIIおよびNotIで切断後、HindIII-NotI断片を取得した。プラスミドpCDM8をHindIIIおよびNotIで切断後、HindIII-NotI断片を取得した。上記PCR増幅断片由来のHindIII-NotI断片およびpCDM8由来のHindIII-NotI断片を結合することにより、pCDM8-CRFを造成した。

pCDM8-CRFをHindIIIおよびNotIで切断後、プレプロコルチコトロピン放出ホルモン遺伝子を含むHindIII-NotI断片を取得した。該HindIII-NotI断片を、発現プラスミドpcDNA1/Amp (インビトロジェン社製) のHindIII-NotI間に組み込むことによりpcDNA1/Amp-CRFを構築した。

また、該HindIII-NotI断片を、発現プラスミドpcDNA3.1(+) (インビトロジェン社製) のHindIII-NotI間に組み込むことによりpcDNA3.1-CRFを構築した。

(3) シングルクローンAFF2-34を宿主としたペプチドの発現

実施例3で取得したラット成体雄の視床下部由来の不活化細胞株 (シングルクローンAFF2-34) を、実施例1に記載した方法に準じて培養した。培養後、約 1×10^4 個の細胞をポリ-リジンでコートされた96穴ディッシュの1穴にまき、33°Cで1日間培養した。

培養後、リポフェクトアミン・プラス(ギブコ社製、リポフェクトアミン試薬とプラス試薬からなる)を用いて、プレプロバソプレッシン発現プラスミド (pCDM8-VP)、プレプロコルチコトロピン放出ホルモン発現プラスミド (pCDM8-CRF) またはコントロールプラスミド (pCDM8) をAFF2-34に導入した。遺伝子導入は、プラスミド 0.5 μ g、リポフェクトアミン試薬 0.5 μ l、プラス試薬1 μ l用い、リポフェクトアミン・プラスに添付された説明書に準じて行った。遺伝子導入したAFF2-34株をDMEM/F-12 (FCS) 培地100 μ l中で33°Cで1日間培養した。培養後、培地をDMEM/F-12 (N2) 培地100 μ lに交換し、33°Cでさらに2日間培養した。

培養後、培養上清を取得し、該培養上清中のバソプレッシン活性およびコルチ

コトロピン放出ホルモン活性を測定した。バソプレッシン活性は、下記実施例21の(1)で構築したアッセイ細胞を用いて測定した。コルチコトロピン放出ホルモン活性は、実施例21の(2)で構築したアッセイ細胞を用いて測定した。

プレプロバソプレッシン発現プラスミドを導入した細胞由来の培養上清中にはバソプレッシン活性が、プレプロコルチコトロピン放出ホルモン発現プラスミドを導入した細胞由来の培養上清中にはコルチコトロピン放出ホルモン活性が検出された。コントロールプラスミドを導入した細胞由来の培養上清中にはいずれの活性も検出されなかった。

以上の結果から、視床下部由来の不死化細胞株(シングルクローンAFF2-34)を宿主として活性ペプチドの前駆体遺伝子を発現させることにより、活性ペプチドを生産できることが明らかになった。

(4) シングルクローンAFF2-404を宿主としたペプチドの発現

実施例3で取得したラット成体雄の視床下部由来の不死化細胞株(シングルクローンAFF2-404)を用い、上記(3)と同様な実験を行った。ただし、AFF2-404への遺伝子導入は、プラスミドを $0.2\mu\text{g}$ 、リポフェクトアミン2000(ギブコ社製)を $0.5\mu\text{l}$ 使用して行った。

上記同様、AFF2-404を宿主として用いた場合にも、活性ペプチドの前駆体遺伝子を発現させることにより、活性ペプチドを生産できることが明らかになった。

(5) 活性ペプチドの生産に適した細胞株の選択法

実施例3で取得したラット成体雄の視床下部由来の不死化細胞株(混合物)を用い、再度シングルクローン化することにより、新たに708個のシングルクローンを取得した。上記(3)の方法に準じて、シングルクローンにプレプロバソプレッシン発現プラスミド(pcDNA3.1-VP)を導入した株のバソプレッシン活性を測定した。

バソプレッシンの活性が高かった6種のシングルクローン(AF2-C3、AF2-C11、AF2-E2、AF2-E11、AF2-F7、AF2-G5)を優良株として取得した。

(6) 活性ペプチド前駆体遺伝子の発現クローニング系の構築

上記(5)で取得したシングルクローンAF2-E2およびAF2-G5を、実施例1に記載した方法に準じて培養した。培養後、約 2×10^4 個の細胞をポリ-リジンでコートされた96穴デッシュの各穴にそれぞれまき、 33°C で1日間培養した。培養後、リポフェクトアミン・プラス(ギブコ社製)を用いて、下記(i)～(iii)のプラスミドを

それぞれ導入した。遺伝子導入は、プラスミド 0.2 μ g、リポフェクトアミン試薬 0.5 μ l、プラス試薬 1 μ l用い、リポフェクトアミン・プラスに添付された説明書に準じて行った。

- (i)コントロールプラスミド [pcDNA3.1(+)]
- (ii)アレプロバソプレッシン発現プラスミド (pcDNA3.1-VP)
- (iii)pcDNA3.1-VPをpcDNA3.1(+)で1/10に希釈した混合プラスミド

導入後、各細胞をDMEM/F-12 (FCS) 培地100 μ l中で33°Cで1日間培養した。培養後、培地をDMEM/F-12(N2)培地100 μ lに交換し、33°Cでさらに2日間培養した。該培養細胞上に、実施例21の(1)で構築したアッセイ細胞を重層後、1mmol/LのATPを添加した。添加6時間後に、セレンテラジンh (coelenterazine h: モレキュラー・プローブズ社) (終濃度250nmol/L) を添加し、VIMカメラ (ARGUS-50/2Dルミノメータ/MP: 浜松ホトニクス社製) を用い、レポーター (ウミシイタケ・ルシフェラーゼ) の活性を測定した。

アレプロバソプレッシン発現プラスミドpcDNA3.1-VP (非希釈) を導入した場合には、いずれの細胞においても活性が検出され、ベクター [pcDNA3.1(+)] のみを導入した場合は、活性は検出されなかった。

また、いずれの細胞においても、発現プラスミドをベクターで1/10まで希釈しても活性が検出された。1/10まで希釈しても活性が検出できることより、適当な視床下部細胞株を宿主として選択して用いることにより、少なくとも10種の遺伝子やライブラリーを同時に宿主細胞に導入して、目的の活性を測定することができることが明らかになった。

また、活性ペプチドの生産に適した各種細胞株を宿主として、ランダムペプチドをコードする遺伝子を発現させることにより、多種のペプチドを効率よく生産することができる。例えば、任意の活性ペプチド前駆体遺伝子の活性ペプチドをコードしている遺伝子部分を、ランダムペプチドをコードする遺伝子と置換することによって、ランダムペプチドを発現する遺伝子を作製することができる。

[実施例10] スルホニルウレアに反応する視床下部由来細胞株の同定

(1) 視床下部由来の不活化細胞株 (混合物) を用いたスルホニルウレアに反応する細胞株の検出

実施例3で取得したラット成体雌の視床下部由来の不死化細胞株（混合物）を、実施例1に記載した方法に準じて培養した。培養後、細胞に5 μ mol/LのFura-2AMを添加し、37°Cで1時間培養した。得られた細胞をHBSSバッファー（ギブコ社製）で2回洗浄後、該細胞を浮遊させた。約1 \times 10⁶個の細胞に最終濃度が0.5mmol/Lになるようにスルホニルウレア（Tolbutamide；アレキシス社製）を添加し、細胞内Ca²⁺濃度の上昇を調べた。細胞内Ca²⁺濃度の測定は、CAF-110器機（日本分光社製）を用いて行った。

その結果、上記不死化細胞株（混合物）中にスルホニルウレアに反応する細胞株が存在することが判明した。結果を第8図（a）に示した。

（2）視床下部由来の不死化細胞株（シングルクローン）を用いたスルホニルウレアに反応する細胞株の同定

上記（1）と同様にして、実施例3で取得したラット成体雄の視床下部由来の不死化細胞株（シングルクローンAMN2-25）のスルホニルウレアへの反応性を調べた。第8図（b）に示したように、AMN2-25も、スルホニルウレアに反応して細胞内Ca²⁺濃度が上昇することが判明した。この結果は、シングルクローンAMN2-25がスルホニルウレア受容体を発現していることを示している。

上記方法により、スルホニルウレアに反応する視床下部由来の不死化細胞株（シングルクローン）を同定または選択することができる。また、上記結果は、実施例1～3で取得したラットの胎児、新生児、成体雄、あるいは成体雌の視床下部由来の不死化細胞株（混合物あるいはシングルクローン）を、任意の物質（蛋白質、ペプチド、化合物、薬物、細胞、細胞の培養上清、あるいは細胞の抽出液等）と接触させ、該物質に反応する視床下部由来細胞株が存在するかどうかを調べることにより、視床下部由来細胞株に反応する物質を探索することができることも示している。

[実施例11] 脾臓ランゲルハンス氏島由来細胞株の樹立

Exp. Anim. 48, 255 (1999)に記載の方法で作製した、温度感受性変異株SV40tsA58のラージT抗原遺伝子を導入したトランスジェニックラット（ワイエスニューテクノロジー研究所から入手）から、既知の方法〔高木良三郎、浜口和之、小野順子、新生化学実験講座 第18巻、細胞培養技術154-159頁〕に準じて脾臓を

摘出した。即ち、ラット脾臓に、0.7mg/mlコラゲナーゼ（和光純薬社製）を含むハンクス液を注入した後、脾臓を摘出した。

該脾臓を50mlチューブに入れ、37°Cの恒温槽で30分間振とうした後、氷冷した0.5%牛血清アルブミン〔シグマ（Sigma）社製：以下BSAと略す〕を含むハンクス液〔137mmol/L NaCl、5.4mmol/L KCl、0.3mmol/L Na_2HPO_4 、0.4mmol/L KH_2PO_4 、2.8mmol/L Glucose、0.8mmol/L MgSO_4 、1.3mmol/L CaCl_2 、10mmol/L HEPES/NaOH（pH7.4）、5mmol/L Sodium pyruvate〕を8ml添加し、激しく振とうして脾組織をほぐした。

該脾組織を、日立社製の遠心分離機（himacSCT-5BA）を用いて、1200回転/分で2分間遠心分離して沈殿を取得した。該沈殿に氷冷したハンクス液を40ml加えて懸濁後、1200回転/分で2分間遠心分離して沈殿を取得した。この操作を遠心後の上清に濁りがなくなるまで行った。

得られた沈殿にハンクス液を40ml加えて懸濁後、懸濁液を金属の茶漉し（タイガーラウン社製）でろ過した。得られたろ過液に氷冷したハンクス液を20ml加えた後、1200回転/分で2分間遠心分離して沈殿物を取得した。この操作をさらに2回繰り返した。

得られた沈殿にヒストパーク-1077（シグマ社製）を10ml加えて懸濁後、5mlずつ15mlチューブ（FALCON社）に分注した。該分注懸濁液の上に、室温のハンクス液5mlを、パスツールピペットを用いて静かに重層し、室温、2300回転/分の条件で15分間遠心分離した。

境界面に集まったランゲルハンス氏島をパスツールピペットを用いて集め、0.5% BSAを含むハンクス液を10ml加えた後、1200回転/分で2分間遠心分離して沈殿を取得した。該沈殿に0.5% BSAを含むハンクス液を10ml加えた後、1200回転/分で2分間遠心分離して沈殿（ランゲルハンス氏島）を取得した。この操作をさらに1回行った。

得られたランゲルハンス氏島を、氷冷した0.5% BSAを含むハンクス液10mlに懸濁し、800回転/分で30秒間遠心分離して沈殿を取得した。該沈殿を10mlの Ca^{2+} ・ Mg^{2+} 不含平衡塩類溶液〔8g/l NaCl、0.3g/l KCl、0.05g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、0.025g/l KH_2PO_4 、1g/l NaHCO_3 、2g/l グルコース：以下CMF液と略す〕に懸濁後、800回転/分で1分間遠心分離して沈殿を取得した。

該沈殿に0.02% EDTAを含むCMF液を10ml加え、室温で5分間ゆっくりと振とうした後、1200回転/分で1分間遠心分離して沈殿を取得した。該沈殿に10mlのCMF液を加えて懸濁後、1200回転/分で1分間遠心分離して沈殿を取得した。該沈殿を3.3mg/mlのディスパーゼ（三光純薬社製）を含むCMF液（10ml）に懸濁し、室温で15分間ゆっくり振とうした後、1200回転/分で1分間遠心分離して沈殿（ランゲルハンス氏島由来細胞）を取得した。

得られたランゲルハンス氏島由来細胞を10mlのCMF液を用いて3回洗浄後、2つに分け、(1) 10% 牛胎児血清、50U/ml ペニシリン、および50 μ g/ml ストレプトマイシンを添加した、DMEM培地（シグマ社製：製品番号D-5796）〔以下、DMEM（D-5796）培地と呼ぶ；該培地には25mmol/Lのグルコースが含まれている〕、または(2) 10% 牛胎児血清、50U/ml ペニシリン、および50 μ g/ml ストレプトマイシンを添加した、RPMI1640培地（日水製薬製：製品番号05918）〔以下、RPMI1640(05918)培地と呼ぶ〕の2種の培地（10ml）を用い、ポリ-リジンでコートされた100mmディッシュ（ベクトン・ディッキンソン社製）中、33℃、炭酸ガス濃度5%、湿度100%の条件下で培養した。

細胞が増殖して飽和した時点で、それぞれの培地を用いて、培養面に対する細胞密度が約70%になるように、ポリ-リジンでコートされた100mmディッシュ中に継代した。それぞれの培地で約3ヶ月間培養を継続し、ランゲルハンス氏島由来の不死化細胞株の混合物を得た。取得したランゲルハンス氏島由来の不死化細胞株の混合物を、それぞれ約 5×10^6 細胞となるようにチューブ5本に分注し、公知の方法で凍結保存した。

凍結保存細胞を用い、下記コロニー形成法によりシングルクローン化を行った。ポリ-リジンでコートされた100mmディッシュ（ベクトン・ディッキンソン社製）に100個あるいは500個の細胞をまき、それぞれの培地を用いて、コロニーが形成されるまで培養した。培養後、顕微鏡下で観察しながらチップの先で各コロニーを剥がし、同時にチップ内に吸引して細胞を回収した。回収した各コロニー由来の細胞は、ポリ-リジンでコートされた24穴プレートにまき、それぞれの培地を用いて培養した。細胞が増殖して飽和した時点で、6穴プレートおよび100mmディッシュ（いずれもポリ-リジンでコートされたもの）に順次スケールアップした。

上記コロニー形成法により、RPMI1640(05918)培地より117個の、DMEM(D-5796)

培地を用いて144個のシングルクローン化した細胞株を取得した。RPMI1640 (05918)培地を用いて取得された細胞株は、それぞれR-1～R-45、M-1～M-63、およびF-1～F-9と、DMEM(D-5796)培地を用いて取得された細胞株は、それぞれD-1～D-72、およびD2-1～D2-72と命名した。取得した細胞株をそれぞれ公知の方法で凍結保存した。取得した細胞株のダブリングタイムは36～72時間であった。また、樹立後1年以上経過した後も、細胞株の増殖性に顕著な変化は見られなかった。

【実施例12】 豚臓ランゲルハンス氏島由来細胞株における各種遺伝子の発現解析

実施例11で取得したランゲルハンス氏島由来の不死化細胞株（混合物またはシングルクローン）の、ランゲルハンス氏島で発現している第6表に示した各種遺伝子に関する発現状況を下記方法により解析した。

実施例11で取得した細胞株を、実施例11に記載の方法に準じて培養した。培養後、約 1×10^5 個の細胞をポリ-リジンでコートされた100mmディッシュにまき、培養温度を33°Cで5日間培養した。

培養後、各細胞株からRNeasy Mini Kit(キアゲン社製)を用いて全RNAを取得した。該全RNAを5 μ g用い、SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (ギブコ社製)により一本鎖cDNAを合成した。該一本鎖cDNAを水で50倍希釈し、PCRの鋳型として使用した。

該一本鎖cDNA (5 μ l) に、第6表に示した遺伝子特異的プライマー (各20pmol)、2.5mmol/L dNTP混合液を1.6 μ l、DMSOを1 μ l、5単位/ μ lのRecombinant Ex Taq DNA Polymerase (宝酒造社製)を0.1 μ l、10 \times 反応緩衝液 (宝酒造社製)を2 μ l添加し、滅菌水を加えて全量を20 μ lに調製した。該調製液を用い、下記条件でPCRを行った。サーマルサイクラーDNA Engine (MJ Research社製)を用い、95°C5分間の熱処理後、94°Cで1分間、60、65あるいは67°C (各遺伝子増幅に対応する反応温度を第6表に示した)で1分間、72°Cで1分間からなる反応を25～35サイクル行った。

該反応液の一部 (8 μ l) をアガロースゲル電気泳動に供した後、ゲルをSYBR Green I nucleic acid stain (モレキュラー・プローブズ社)で染色した。増幅されたDNA断片のパターンをフルオロイメジャー (FluorImager SI; Molecular Dynamics社製)で解析することにより、増幅されたDNA断片の量を測定した。

各遺伝子の転写産物の定量は、常法〔PCR Protocols, Academic Press(1990)〕にしたがって半定量的PCR法により行った。ラット・グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ（以下、G3PDHと略す）の転写産物を同時に定量することにより、細胞間でのmRNA量の違いや、サンプル間での逆転写酵素によるmRNAから一本鎖cDNAへの変換効率に大差ないことを確認した。G3PDH転写産物の定量は、常法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 2725 (1990); J. Biol. Chem., 269, 14730 (1994); 特開平06-181759〕にしたがって定量的PCR法により行った。

第6表

No.	遺伝子	プライマー (配列番号)	反応温度 (℃)
1	プレプロインスリン	53, 54	60
2	プレプログルカゴン	55, 56	60
3	プレプロソマトスタチン	57, 58	65
4	プレプロ膵ポリペプチド	59, 60	60
5	PC1	61, 62	65
6	PC2	63, 64	65
7	GLP-1受容体(GLP-1R)	65, 66	67
8	PDX1	67, 68	65
9	ニューロD	75, 76	60
10	Pax4	69, 70	65
11	Pax6	71, 72	65
12	ニューロジェニン3	73, 74	65
13	Nkx2.2	77, 78	65
14	Nkx6.1	79, 80	65
15	グルコキナーゼ	81, 82	65
16	2型グルコーストランスポーター	83, 84	65
17	ベータセルリン	85, 86	65

解析した結果のうち、第7-1表～第7-6表にD-1～D-72、D2-1～D2-72、R-1～R-45の各細胞株の、プレプロインスリン（表中ではInsで表した）、プレプログルカゴン（表中ではGluで表した）、プレプロソマトスタチン（表中ではSMで表した）、プレプロ胰ポリペプチド（表中ではPPで表した）、PC1、PC2、GLP-1受容体(GLP-1R)、PDX1、ニューロDの各遺伝子についての発現量を+++、++、+、+/-、-で示した。上記の(1)～(17)の遺伝子の発現パターンが異なる多様な細胞株が取得されていることが明らかになった。

第7-1表 ラットランゲルハンス氏島由来細胞株の遺伝子発現 (1)

遺伝子 細胞株	1	2	3	4	5	6	7	8	9
D-1	+/-	-	-	+/-	-	-	-	+++	++
D-2	-	-	-	+/-	-	-	-	+	+/-
D-3	-	-	-	+	-	-	-	++	+
D-4	-	-	-	+	-	-	-	+	+
D-5	-	-	-	+/-	-	-	-	++	+
D-6	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-
D-7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-8	-	-	-	+/-	-	-	-	++	+
D-9	-	-	-	+/-	-	-	-	-	-
D-10	+/-	-	-	+/-	-	-	-	++	+/-
D-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-12	-	-	+/-	+	-	++	+	+++	++
D-13	-	-	-	+	-	-	++	+++	+
D-14	+/-	-	-	+/-	-	-	-	+++	+
D-15	+/-	-	-	+	-	-	-	+++	++
D-16	-	-	-	+++	-	-	-	+++	++
D-17	-	-	-	++	-	-	-	+++	+
D-18	-	-	-	+++	-	-	+	+++	++
D-19	-	-	-	-	-	-	-	+++	++
D-20	+/-	-	-	+	-	-	-	+++	++
D-21	+/-	-	+/-	+	-	-	+	+++	+++
D-22	-	-	-	+	-	-	-	+++	+++
D-23	-	-	-	+	-	-	-	+++	+++
D-24	-	-	+/-	+	-	-	-	+++	+++
D-25	-	-	-	+	-	-	+	+++	+++
D-26	-	-	-	++	-	-	-	+++	+++
D-27	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++
D-28	-	-	-	+	-	-	+	+++	+++
D-29	-	-	-	++	-	-	-	+++	+++
D-30	-	-	-	++	-	-	-	+++	+++
D-31	-	+	+/-	++	-	-	-	+++	+++
D-32	-	-	-	+	-	-	-	+++	+++
D-33	-	-	-	+	-	-	++	+++	+++
D-34	-	-	-	++	-	-	-	+++	+++
D-35	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++
D-36	-	-	-	+	-	-	-	+++	+++

各遺伝子の発現量を、+++、++、+、+/-、-で示した。

細胞株：実施例 11 で取得されたランゲルハンス氏島由来の細胞株

遺伝子：第 6 表に記載の遺伝子に対応

第7-2表 ラットランゲルハンス氏島由来細胞株の遺伝子発現 (2)

遺伝子 細胞株	1	2	3	4	5	6	7	8	9
D-37	+	+/-	+	+	-	-	-	+++	+++
D-38	+	-	+/-	+	-	-	-	+++	+++
D-39	+	-	-	+	-	-	++	+++	+++
D-40	++	-	-	+	-	-	-	+++	+++
D-41	++	-	-	+	-	-	-	+++	+++
D-42	++	++	-	-	-	-	-	+++	+++
D-43	+	++	-	+	++	++	++	+	+++
D-44	+	+	-	-	-	+	+	+	+++
D-45	+	++	-	+/-	+/-	++	-	+	+++
D-46	+	+	-	+/-	+	+++	-	+	+++
D-47	-	+	-	+	+/-	++	+	+	+/-
D-48	-	+	-	++	+/-	++	-	+	+
D-49	-	-	-	+	+/-	++	+		++
D-50	-	+	-	+	-	++	++	+	++
D-51	+	+	-	-	+	+++	-	++	++
D-52	+	+++	-	+	++	++	-	++	++
D-53	+	-	-	+/-	+	++	+	++	++
D-54	+	+	-	-	-	+++	+	++	++
D-55	+	-	-	+	+/-	++	-	++	++
D-56	++	++	+/-	+/-	+/-	++	-	++	++
D-57	+++	+++	-	+	+	+	+	+++	++
D-58	+	+	-	+/-	-	+++	+	+++	++
D-59	+	-	-	++	++	+	++	+++	++
D-60	+	+/-	+/-	+	++	++	-	+++	++
D-61	+	-	-	+	-	-	++	+++	++
D-62	+/-	-	-	+	-	-	++	+++	++
D-63	+/-	-	-	+	-	-	+	+++	++
D-64	+/-	-	-	+	-	-	++	+++	++
D-65	-	-	-	++	-	-	+++	+++	++
D-66	+/-	-	-	++	-	-	+	+++	++
D-67	+/-	-	-	+	-	-	++	+++	++
D-68	+/-	-	-	-	-	+/-	-	+++	++
D-69	+	-	-	+	-	-	++	+++	++
D-70	+	-	-	+	-	-	-	+++	++
D-71	+	-	-	-	-	-	-	+++	++
D-72	+	-	+	+	-	-	-	+++	++

各遺伝子の発現量を、+++、++、+、+/-、-で示した。

細胞株：実施例 11 で取得されたランゲルハンス氏島由来の細胞株

遺伝子：第 6 表に記載の遺伝子に対応

第7-3表 ラットランゲルハンス氏島由来細胞株の遺伝子発現 (3)

遺伝子 細胞株	1	2	3	4	5	6	7	8	9
D2-1	+/-	-	-	+	+/-	++	+	++	
D2-2	+/-	+	+	+	+++	+++	-	++	
D2-3	+/-	-	-	+	-	-	+	++	
D2-4	+	-	-	+	+	-	++	+++	
D2-5	+	+/-	-	+	+/-	+	-	++	
D2-6	+	-	+/-	++	+	++	-	++	
D2-7	+	-	+/-	+/-	+	++	-	++	
D2-8	++	-	-	+	-	-	+	+++	
D2-9	+/-	+/-	-	+++	+/-	-	+	++	
D2-10	+/-	+	-	-	-	+	+	++	
D2-11	+	-	+/-	++	-	-	++	++	
D2-12	+	-	-	+	+/-	-	+	++	
D2-13	+/-	+/-	+/-	+	-	-	+	++	
D2-14	+/-	-	-	++	-	+/-	+	++	
D2-15	+/-	+/-	-	++	-	-	++	++	
D2-16	+	+/-	+/-	+	++	-	+++	++	
D2-17	+/-	+/-	+/-	+	-	-	+	++	
D2-18	+/-	-	-	++	-	-	-	++	
D2-19	-	-	-	++	-	-	++	+	
D2-20	+	+/-	-	-	+/-	+/-	-	++	
D2-21	+	+/-	-	+/-	-	+/-	+	+++	
D2-22	+	+/-	-	+/-	+	-	-	+++	
D2-23	+	+/-	+/-	+/-	-	+++	-	+++	
D2-24	+	-	-	+/-	-	-	-	+++	
D2-25	+/-	+/-	-	+	+/-	-	-	++	
D2-26	+/-	-	-	+/-	-	-	-	++	
D2-27	+/-	+	-	+	-	+/-	+	+	
D2-28	+/-	+/-	-	+/-	+/-	-	-	+	
D2-29	-	+/-	-	+/-	+/-	-	-	+	
D2-30	+	-	-	+	+/-	-	-	++	
D2-31	+/-	-	-	-	+/-	+	+	+	
D2-32	+/-	+/-	-	+/-	-	-	-	+	
D2-33	+/-	-	-	+++	-	-	-	++	
D2-34	-	+	-	+	-	-	-	+	
D2-35	+/-	++	-	-	-	-	++	+	
D2-36	-	-	-	-	+	+	-	+	

各遺伝子の発現量を、+++、++、+、+/-、-で示した。

細胞株：実施例 11 で取得されたランゲルハンス氏島由来の細胞株

遺伝子：第 6 表に記載の遺伝子に対応

表7-4 ラットランゲルハンス氏島由来細胞株の遺伝子発現 (4)

細胞株 \ 遺伝子	1	2	3	4	5	6	7	8	9
D2-37	-	+/-	-	+/-	-	++	+/-	++	
D2-38	-	-	-	+/-	+/-	++	+/-	++	
D2-39	-	-	-	+/-	-	++	-	+	
D2-40	-	-	-	+/-	+/-	+	+	+	
D2-41	-	-	-	+/-	+/-	++	-	+	
D2-42	-	+/-	-	+/-	+	++	-	++	
D2-43	-	+/-	-	+/-	-	++	-	+	
D2-44	-	-	+/-	+	-	++	-	+	
D2-45	-	-	-	-	-	+++	-	++	
D2-46	-	+/-	+/-	+	+/-	++	+/-	+	
D2-47	-	+	+/-	+	+	++	-	+	
D2-48	-	+	+/-	+	+	+	-	+	
D2-49	-	-	+	+/-	-	+	-	+	
D2-50	-	+	-	+/-	-	+	-	++	
D2-51	-	-	+	+	+	+++	+/-	++	
D2-52	-	-	-	+	-	+++	+/-	++	
D2-53	-	-	-	+/-	+	-	+/-	++	
D2-54	-	+	-	+/-	-	+	-	++	
D2-55	-	-	+/-	+/-	+/-	+	++	++	
D2-56	-	+	+/-	+/-	+/-	+/-	-	++	
D2-57	-	+	-	+	-	+++	-	++	
D2-58	-	+/-	-	+/-	-	+++	-	++	
D2-59	-	-	-	+/-	-	-	-	++	
D2-60	-	-	-	+	-	+	++	++	
D2-61	-	-	-	+/-	-	++	-	++	
D2-62	-	-	-	+/-	++	++	+/-	++	
D2-63	-	-	+/-	+/-	-	++	-	++	
D2-64	-	+/-	-	+/-	+/-	+	-	++	
D2-65	+	-	-	-	-	-	-	-	
D2-66	-	-	-	+/-	+/-	++	-	+	
D2-67	-	-	-	-	+/-	+	-	+	
D2-68	-	-	-	+	+	-	-	++	
D2-69	-	-	+/-	-	+/-	++	-	++	
D2-70	-	-	+/-	-	-	+++	-	+++	
D2-71	-	-	-	+	-	-	-	++	
D2-72	-	+	-	-	-	++	+/-	+++	

各遺伝子の発現量を、+++、++、+、+/-、-で示した。

細胞株：実施例 11 で取得されたランゲルハンス氏島由来の細胞株

遺伝子：第 6 表に記載の遺伝子に対応

第7-5表 ラットランゲルハンス氏島由来細胞株の遺伝子発現 (5)

遺伝子 細胞株	1	2	3	4	5	6	7	8	9
R-1	+/-	-	+/-	+	++	-	+/-	+++	++
R-2	+/-	-	-	+	-	-	-	+++	++
R-3	+/-	-	-	-	-	+/-	+/-	+++	++
R-4	-	+/-	+/-	+	+/-	-	-	+++	+
R-5	-	-	-	+/-	+/-	+/-	-	++	+
R-6	-	+/-	-	+/-	-	+/-	+	++	+
R-7	+/-	-	-	+/-	-	-	-	+++	++
R-8	+/-	+/-	+/-	-	-	++	-	+++	++
R-9	+/-	-	-	-	-	++	-	+++	++
R-10	+/-	-	-	-	-	++	-	+++	++
R-11	+/-	-	-	-	-	+	-	+++	++
R-12	+/-	-	-	-	-	++	+/-	+++	++
R-13	-	-	-	+/-	+/-	+/-	-	+++	++
R-14	+/-	-	-	-	-	+/-	-	++	++
R-15	-	-	-	+++	+	-	+/-	+++	+
R-16	-	-	-	-	-	-	-	-	
R-17	+/-	-	-	-	-	++	-	+++	++
R-18	+/-	-	-	+	-	-	+	+++	++
R-19	-	+/-	+/-	-	-	+++	-	++	+/-
R-20	+	-	+/-	+/-	-	-	-	+++	++
R-21	+/-	-	+/-	+/-	+	-	-	+++	++
R-22	-	-	-	++	-	+/-	-	+++	++
R-23	+/-	-	-	-	-	+/-	-	+++	++
R-24	+/-	-	+/-	-	-	+	-	+++	++
R-25	-	-	+/-	+/-	-	+/-	++	+++	++

各遺伝子の発現量を、+++、++、+、+/-、-で示した。

細胞株：実施例 11 で取得されたランゲルハンス氏島由来の細胞株

遺伝子：第 6 表に記載の遺伝子に対応

第7-6表 ラットランゲルハンス氏島由来細胞株の遺伝子発現 (6)

遺伝子 細胞株	1	2	3	4	5	6	7	8	9
R-26	+	-	-	-	-	+/-	-	+++	++
R-27	+	-	-	-	-	+++	-	+++	++
R-28	-	+/-	++	++	+	+/-	+++	+++	++
R-29	-	+/-	+/-	-	+/-	+	-	+++	++
R-30	-	-	+/-	+	+	+/-	+	+++	++
R-31	-	-	-	-	+/-	+	-	+++	+
R-32	-	-	-	+/-	-	+	-	+++	+
R-33	-	-	-	-	-	++	-	+++	++
R-34	-	-	+/-	++	+	-	+	+++	++
R-35	+	-	+	++	-	-	++	+++	++
R-36	+	-	-	-	+/-	++	-	++	++
R-37	+/-	+/-	-	-	-	+/-	-	+++	++
R-38	+/-	-	-	-	+/-	+	-	+++	++
R-39	+/-	+	+/-	+/-	+	+/-	-	+++	++
R-40	++	-	-	-	+/-	+/-	-	+++	+++
R-41	-	-	+/-	+/-	+/-	+/-	-	+++	++
R-42	+/-	-	+/-	+/-	+/-	-	+/-	+++	++
R-43	+/-	-	+/-	-	-	+++	-	+++	++
R-44	-	+/-	+/-	++	+/-	-	+/-	+++	++
R-45	-	-	+/-	-	-	-	-	++	++

各遺伝子の発現量を、+++、++、+、+/-、-で示した。

細胞株：実施例 11 で取得されたランゲルハンス氏島由来の細胞株

遺伝子：第 6 表に記載の遺伝子に対応

〔実施例13〕 膵臓ランゲルハンス氏島由来細胞株における各種遺伝子産物の発現解析

(1) インスリンの発現解析およびインスリン発現細胞の取得

RPMI1640(05918)培地を用いて取得した実施例11に記載の不死化細胞株の混合物

(約 1×10^3 細胞)をCELL-TAKでコートされた8チャンバーのLab-Tek chamber slide (Nalge Nunc International社製)にまき、RPMI1640 (05918)培地を用い、33°Cで2日間培養した。

培養後、培地を除き、4%パラフォルムアルデヒド溶液を加え、4°Cで10分間反応させ、細胞を固定した。該固定化細胞を0.3%トリトンX-100溶液で処理した後、1%牛胎児血清を含んだPBSを添加し、室温で30分間放置し、ブロッキングを行った。ブロッキング後、1000倍希釈した抗インスリン抗体(シグマ社製)を添加し、37°Cで60分間反応させた。反応後、1%牛胎児血清を含んだPBSで3回洗浄し、200倍希釈したAlexa488標識抗ヤギIgG(モレキュラー・プローブズ社製)を添加し、室温で60分間反応させた。反応後、PBSで2回洗浄し、 $1 \mu\text{g/ml}$ のヘキスト33342溶液(カルビオケム社製)を添加し、室温で5分間反応させて核を染色した。

染色後、PBSで2回洗浄し、乾燥させ、退色防止剤溶液でマウントし、蛍光顕微鏡下で観察した。その結果、インスリンを発現する細胞が存在していることが判明した。

RPMI1640(05918)培地を用いて取得した、実施例11に記載の不死化細胞株の各シングルクローンについても下記方法でインスリン発現細胞の存在を確認した。

RPMI1640(05918)培地を用いて取得した、実施例11に記載の各シングルクローン(約 1×10^4 細胞)を96穴プレートの1穴にまき、RPMI1640(05918)培地を用いて33°Cで2日間培養した。培養後、上記と同様の方法で、抗インスリン抗体を用いた免疫染色およびヘキスト33342を用いた核染色を行った。その結果、シングルクローンM-8、M-9、およびM-15がインスリンを発現していることが明らかになった。

(2) プロセシング酵素PC1の発現解析およびPC1発現細胞の取得

RPMI1640(05918)培地を用いて取得した実施例11に記載の不死化細胞株の各シングルクローン(約 1×10^4 細胞)を96穴プレートの1穴にまき、RPMI1640(05918)培地を用いて33°Cで2日間培養した。

培養後、上記(1)の方法に準じて、抗PC1抗体を用いた免疫染色およびヘキスト33342を用いた核染色を行った。抗体としては、50倍希釈した抗PC1抗体(ケミコン・インターナショナル社製)を使用した。その結果、シングルクローンM-9およびM-33がPC1を発現していることが明らかになった。

(3) プロセシング酵素PC2の発現解析およびPC2発現細胞の取得

RPMI1640培地を用いて取得した実施例11に記載の不死化細胞株の各シングルクローン（約 1×10^4 細胞）を96穴プレートの1穴にまき、RPMI培地を用いて33°Cで2日間培養した。

培養後、上記（1）の方法に準じて、抗PC1抗体を用いた免疫染色およびヘキスト33342を用いた核染色を行った。抗体としては、50倍希釈したChemicon International社製の抗PC2抗体を使用した。その結果、シングルクローンM-9、M-15、およびF-1～F-9等多くの細胞がPC2を発現していることが明らかになった。

〔実施例14〕 スルホニルウレアに反応するランゲルハンス氏島由来細胞株の同定

RPMI1640（05918）培地を用いて取得した実施例11に記載の不死化細胞株のシングルクローン（M-6、M-9、M-15、M-19、M-20、M-33、M-43、F-1、F-9）約 5×10^6 細胞を、60mmディッシュにまき、RPMI1640（05918）培地を用いて33°Cで2日間培養した。

培養後、これら細胞に $5 \mu\text{mol/L}$ のFura-2AMを添加し、37°Cで1時間培養した。培養後、HBSSバッファー（ギブコ社製）で2回洗浄し、細胞を浮遊させた。該細胞約 1×10^6 個に最終濃度が 0.5 mmol/L になるようにスルホニルウレア（Tolbutamide、アレキシス社製）を添加し、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を調べた。細胞内 Ca^{2+} 濃度の測定は、CAF-110器機（日本分光社製）を用いて行った。

その結果、調べた全てのシングルクローンにおいて、スルホニルウレアに反応して細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇することが判明した。この結果は、調べた全てのシングルクローンがスルホニルウレア受容体を発現していることを示している。

以上の結果は、実施例11で取得したラットのランゲルハンス氏島由来の不死化細胞株（混合物あるいはシングルクローン）を、任意の物質（蛋白質、ペプチド、化合物、薬物、細胞、細胞の培養上清、あるいは細胞の抽出液等）と接触させ、該物質に反応するランゲルハンス氏島由来細胞株が存在するかどうかを調べることにより、ランゲルハンス氏島由来細胞株に反応する物質を探索することができることも示している。

〔実施例15〕 膵臓ランゲルハンス氏島由来細胞株の培養法の検討

（1）培地の検討

実施例13の(3)でPC2を発現していることが確認されたシングルクローン(18クローン)を、RPMI1640(05918)培地を用いて33°Cで培養後、約 1×10^4 個の細胞を96穴プレートの1穴にまき、RPMI1640(05918)培地あるいはDMEM(D-5796)培地を用いて33°Cで2週間培養した。培養後、実施例13の(2)および(3)に示した方法を用いて、PC1およびPC2の発現量を検討した。

その結果、多くの細胞株において、DMEM(D-5796)培地で培養することにより、生育が遅くなり、PC1およびPC2の発現が増加することが明らかになった。この結果は、RPMI1640(05918)培地で培養していた細胞を、DMEM(D-5796)培地に置換して2週間培養することにより、上記ランゲルハンス氏島由来細胞株の分化形質を制御することができることを示している。第9図に、細胞株F-8を用いて得られた結果を示した。

(2) 培養温度の検討

上記(1)と同じシングルクローンを、RPMI1640(05918)培地を用いて33°Cで培養後、約 1×10^4 個の細胞を96穴プレートの1穴にまき、RPMI1640(05918)培地またはDMEM(D-5796)培地を用いて、33°Cまたは37°Cで2週間培養した。培養後、実施例13の(2)および(3)に示した方法を用いて、PC1およびPC2の発現量を検討した。

その結果、シングルクローンF-1においては、DMEM(D-5796)培地で37°Cで培養すると、同培地で33°Cで培養した場合に比較して、PC1の発現がさらに増加することが明らかになった。この結果は、33°Cで培養していた細胞を、37°Cで2週間培養することにより、上記ランゲルハンス氏島由来細胞株の分化形質を制御することが可能な場合があることを示している。

[実施例16] ランゲルハンス氏島由来細胞株を宿主とした活性ペプチド発現系の構築

実施例11で取得したラットのランゲルハンス氏島由来の不死化細胞株(シングルクローンF-4、F-5、およびF-8)を、RPMI1640(05918)培地を用いて33°Cで培養後、 $2 \sim 5 \times 10^4$ 個の細胞を96穴プレートの1穴にまき、33°Cで1日間培養した。

培養後、リボフェクトアミン・プラス(ギブコ社製)を用いて、実施例9の(1)で作製したブレプロバソプレッシン発現プラスミド(pcDNA3.1-VP)、実施例9の(2)で作製したブレプロコルチコトロピン放出ホルモン発現プラスミド(

pcDNA3.1-CRF)、あるいはコントロールプラスミド〔pcDNA3.1(+)]を細胞に導入した。遺伝子導入は、プラスミド 0.2 μ g、リポフェクトアミン試薬0.5 μ l、プラス試薬1 μ l用い、リポフェクトアミン・プラスに添付された説明書に準じて行った。

遺伝子導入した株を、RPMI1640(05918)培地100 μ l中、33°Cで1日間培養した。培養後、培地を血清を含まないRPMI1640(05918)培地100 μ lに交換し、33°Cでさらに2日間培養した。培養後、培養上清を取得し、該培養上清中のバソプレッシン活性およびコルチコトロピン放出ホルモン活性を測定した。バソプレッシン活性は、下記実施例21の(1)で構築したアッセイ細胞を用いて測定した。コルチコトロピン放出ホルモン活性は、実施例21の(2)で構築したアッセイ細胞を用いて測定した。

プレプロバソプレッシン発現プラスミドを導入した細胞由来の培養上清中にはバソプレッシン活性が、プレプロコルチコトロピン放出ホルモン発現プラスミドを導入した細胞由来の培養上清中にはコルチコトロピン放出ホルモン活性が検出された。コントロールプラスミドを導入した細胞由来の培養上清中にはいずれの活性も検出されなかった。上記において、RPMI1640(05918)培地の代わりに、DMEM(D-5796)培地を用いても同様の結果が得られた。以上の結果から、ランゲルハンス氏島由来の不死化細胞株(シングルクローンF-4、F-5、およびF-8)を宿主として活性ペプチドの前駆体遺伝子を発現させることにより、活性ペプチドを生産できることが明らかになった。

[実施例17] 膵臓ランゲルハンス氏島由来細胞株を宿主とした活性ペプチドの発現クローニング系の構築

(1) 活性ペプチド前駆体遺伝子の発現クローニング系の構築

実施例16に記載した方法に準じて、ランゲルハンス氏島由来の不死化細胞株(シングルクローンF-8)に、下記(i)~(iii)のプラスミドをそれぞれ導入した。

(i)コントロールプラスミド〔pcDNA3.1(+)]

(ii)プレプロコルチコトロピン放出ホルモン発現プラスミド(pcDNA3.1-CRF)をpcDNA3.1(+))で1/10に希釈した混合プラスミド

(iii)pcDNA3.1-CRFをpcDNA3.1(+))で1/100に希釈した混合プラスミド

導入後、各細胞を、DMEM (LG) 培地100 μ l中で33°Cで2日間培養した。培養後、培地を血清を含まないDMEM (LG) 培地100 μ lに交換し、33°Cでさらに2日間培養した。

得られた細胞上に、下記実施例21の(2)で構築したアッセイ細胞を重層後、25mmol/Lグルコース+100 μ mol/L スルホニルウレア (Tolbutamide) を添加した。添加6時間後に、セレンテラジン h (モレキュラー・プローブズ社) (終濃度250nmol/L) を添加し、VIMカメラ (ARGUS-50/2Dルミノメータ/MP: 浜松ホトニクス社製) を用い、レポーター (ウミシイタケ・ルシフェラーゼ) の活性を測定した。その結果、いずれの希釈サンプルにおいても活性が検出され、発現ベクター [pcDNA3.1(+)] のみを導入した場合は活性は検出されなかった。

1/10~1/100まで希釈しても活性が検出できることより、適当な脾臓ランゲルハンス氏島由来細胞株を宿主として選択して用いることにより、多数 (例えば10~100種のcDNA) を同時に宿主細胞に導入し、該細胞の培養上清、該細胞の細胞抽出液、該細胞の膜画分、または該細胞自身を用いて、目的の活性を測定することができることが明らかになった。

(2) 活性ペプチド前駆体遺伝子の発現クローニング

実施例23に記載した方法に準じて、適当な発現ベクター [pcDNA3.1(+)] (インビトロジェン社製)、pAGal9-nd (下記実施例18) またはpAGal9-d (下記実施例18) を用いてcDNAライブラリー (大腸菌) を構築した。

該cDNAライブラリーを1~100クローンずつのプールに分けて培養した後に、それぞれのプールからプラスミドを回収する。96穴プレートを用いて、該プラスミドを適当なランゲルハンス氏島由来細胞株に導入して発現させる。

3日後に実施例21に記載の方法に準じて作製することのできるアッセイ細胞を重層し、6時間後にレポーター活性を測定する。100クローンずつのプールを用いた場合は、96穴プレート1枚で9600クロンのスクリーニングを行うことができる。活性が検出されたプールをさらに細かいプールに分け、同様の操作を行うことにより、最終的に目的の活性ペプチド前駆体遺伝子を単離することができる。

pAGal9-ndまたはpAGal9-dをベクターとして造成したcDNAライブラリーを用いる時には、該cDNAライブラリーと共に、Gal4pのDNA結合領域と単純ヘルペスウイルスのVP16の転写活性化領域 (transactivation domain) のキメラ蛋白質 [Nature,

335, 563 (1988)] を発現するためのプラスミド〔例えばPCR2.1/Gal4-VP16

(インビトロジェン社製)、pAmo-Gal4VP16 (下記参照)、pcDNA3-Gal4VP16 (下記参照)] を同時に宿主細胞に導入する必要がある。

pAmo-Gal4VP16およびpcDNA3-Gal4VP16の造成について以下に記載する。

pMC1 [J. Mol. Biol., 180, 1 (1984)] を BstBI で切断後、Klenow処理し、さらに AccI で切断することによりVP16遺伝子の3'末端側を含む BstBI (平滑末端) - AccI断片を取得した。pCMVGal4 [EMBO J., 8, 2337, (1989)] を HindIII と ClaI で切断し、Gal4遺伝子の5'末端側配列を含む HindIII - ClaI断片を取得した。pAmo-ndを NotI で切断後、Klenow処理し、さらに HindIII で切断することによりアンピシリン耐性遺伝子を含む NotI (平滑末端) - HindIII断片を取得した。pMC1由来の BstBI (平滑末端) - AccI断片、pCMVGal4由来の HindIII - ClaI断片およびpAmo-nd由来の NotI (平滑末端) - HindIII断片を結合し、Gal4-VP16キメラ遺伝子発現プラスミドpAmo-Gal4VP16を造成した。

pAmo-Gal4VP16 を HindIII と KpnI で切断し、Gal4-VP16キメラ遺伝子を含む HindIII - KpnI断片を取得した。pcDNA3.1+ (インビトロジェン社製) を HindIII と KpnI で切断し、アンピシリン耐性遺伝子を含む HindIII - KpnI断片を取得した。pAmo-Gal4VP16由来の HindIII - KpnI断片およびpcDNA3.1+由来の HindIII - KpnI断片を結合し、pcDNA3-Gal4VP16を造成した。

活性ペプチドの生産に適した各種細胞株を宿主として、ランダムペプチドをコードする遺伝子を発現させることにより、多種のペプチドを効率よく生産することができる。例えば、任意の活性ペプチド前駆体遺伝子の活性ペプチドをコードしている遺伝子部分を、ランダムペプチドをコードする遺伝子と置換することによって、ランダムペプチドを発現する遺伝子を作製することができる。

[実施例18] 新規宿主・ベクター系の構築 (1)

(1) Gal4-ER発現プラスミドpGERbsrR2の造成

pSV2bsr (科研製薬社製) を PvuII と EcoRI で切断後、Klenow処理して2.6kbの PvuII (平滑末端) - EcoRI (平滑末端)断片を取得した。Gal4-ERキメラ遺伝子 [Cell, 54, 199 (1988); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 1657 (1993)] を含有するER α AF2 in pM (東京大学の加藤茂明先生より分与) を AatII と NdeI で切断後、

Klenow処理して、AatII（平滑末端）-NdeI（平滑末端）断片を取得した。上記のpSV2bsr由来のPvuII（平滑末端）-EcoRI（平滑末端）断片、およびER α AF2 in pM由来のAatII（平滑末端）-NdeI（平滑末端）断片を結合することにより、プラスミドpGERbsrR2を造成した。pGERbsrR2は、酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）由来の転写因子Gal4pのDNA結合領域とエストロジェン受容体のリガンド結合領域のキメラ蛋白質（Gal4-ER）を発現することができる。

(2) ホタル・ルシフェラーゼの誘導発現プラスミドの造成

pcDNA3（インビトロジェン社）をXhoIで切断後、Klenow処理して、XhoI（平滑末端）断片を取得した。該断片を結合することにより、XhoI切断部位を消失させたpcDNA3を造成した。

XhoI切断部位を消失させたpcDNA3をKpnIで切断後、Klenow処理して、KpnI（平滑末端）断片を取得した。該断片を結合することにより、XhoIおよびKpnI切断部位を消失させたpcDNA3を造成した。該プラスミドをBglIIで切断後、Klenow処理し、BglII（平滑末端）断片を取得した。pAMoERC3Sc（特開平05-336963）をXhoIとNsiIで切断後、Klenow処理し、oriP配列を含む2.2kbのXhoI（平滑末端）-NsiI（平滑末端）断片を取得した。上記のXhoI切断部位とKpnI切断部位を消失させたpcDNA3由来のBglII（平滑末端）断片、およびpAMoERC3Sc由来のXhoI（平滑末端）-NsiI（平滑末端）断片を結合することにより、プラスミドpcDNA3-oriPを造成した。

pcDNA3-oriPをXhoIとHindIIIで切断し、XhoI-HindIII断片を取得した。pSE0luc2（W098/14474）をXhoIとNcoIで切断後、Klenow処理して、アンピシリン耐性遺伝子を含むXhoI（平滑末端）-NcoI（平滑末端）断片を取得した。該断片を結合することにより、プラスミドpASd1-luc1を造成した。

pASd1-luc1をXhoIとHindIIIで切断後、0.11kbのXhoI-HindIII断片を取得した。上記pcDNA3-oriP由来のXhoI-HindIII断片、およびpASd1-luc1由来のXhoI-HindIII断片を結合し、プラスミドpcDNA3-oriP-Sd1を造成した。

pcDNA3-oriP-Sd1をXhoIとAsp718で切断し、XhoI-Asp718断片を取得した。配列番号87、88、89、および90で表される塩基配列を有する4種のDNAを合成した。該合成DNAは混合してアニールすることによりポリA付加シグナルをもつ2本鎖DNAを形成する。該合成DNAをそれぞれT4 polynucleotide kinaseを用いてリン酸化後、

混合してアニールさせることにより、二本鎖DNAとした。該二本鎖DNAとpcDNA3-oriP-Sd1由来のXhoI-Asp718断片を結合することにより、プラスミドpcDNA3-oriP-Sd1-pAを造成した。

pcDNA3-oriP-Sd1-pAをXhoIで切断後、Klenow処理して、XhoI（平滑末端）断片を取得した。pFR-luc(ストラタジーン社製)をHindIIIとBamHIで切断、Klenow処理し、0.14kbのHindIII（平滑末端）-BamHI（平滑末端）断片を取得した。上記のpcDNA3-oriP-Sd1-pA由来のXhoI（平滑末端）断片、およびpFR-luc由来のHindIII-BamHI断片を結合し、プラスミドpAGalSd1を作製した。pAGalSd1は、Gal4p応答配列（UASG）を5回繰り返した配列を有するプロモーターを含有している。

pAGalSd1をEcoRIで切断後、Klenow処理し、EcoRI（平滑末端）断片を取得した。pSE0luc2（W098/14474）をHindIIIとSacIで切断後、Klenow処理することにより、ホタル・ルシフェラーゼ遺伝子を含む1.7kbのHindIII（平滑末端）-SacI（平滑末端）断片を取得した。上記のpSE0luc2由来のHindIII（平滑末端）-SacI（平滑末端）断片、およびpAGalSd1由来のEcoRI（平滑末端）断片を結合することにより、プラスミドpAGalSd1-lucを造成した。

pAGalSd1-luc内に存在する二つのHindIIIサイトのうち、ホタル・ルシフェラーゼ遺伝子からより離れたHindIIIサイトのみをKlenow処理により消失させることにより、pAGalSd4-lucを造成した。

pAGalSd4-lucをAsp718で切断後、StuIで部分消化しpAGalSd4-luc由来の9.5kbのAsp718-StuI断片を取得した。該DNA断片をKlenow処理し、自己結合させることによりプラスミドpAGal9-lucを造成した。

(3) 誘導発現ベクターpAGal9-dおよびpAGal9-ndの造成

エプスタイン・バー・ウイルスのoriPを有する発現プラスミドpAGal9-lucをHindIIIとSacIで切断し、oriPを含む6.9kbのHindIII-SacI断片を取得した。pAmo-d（特開2001-211885）をHindIIIとSacIで切断し、テトラサイクリン耐性遺伝子（Tc^R）を含むHindIII-SacI断片を取得した。上記のpAGal9-luc由来のHindIII-SacI断片、およびpAmo-d由来のHindIII-SacI断片を結合することにより、pAGal9-luc中のホタル・ルシフェラーゼ遺伝子部分をpAmo-dのStuffer配列と置き換えたプラスミドpAGal9-dを造成した。

pAGal9-lucをHindIIIとSacIでし6.9kbのHindIII-SacI断片を取得した。pAmo-nd

(特開2001-211885)をHindIIIとSacIで切断し、テトラサイクリン耐性遺伝子を含むHindIII-SacI断片を取得した。上記のpAGal9-luc由来のHindIII-SacI断片、およびpAmo-nd由来のHindIII-SacI断片を結合することにより、pAGal9-luc中のホタル・ルシフェラーゼ遺伝子部分をpAmo-ndのStuffer配列と置き換えたプラスミドpAGal9-ndを造成した。

(4) Gal4-ER発現プラスミドpGERbsrR2をNamalwa KJM-1細胞の染色体DNAに組み込んだ細胞株KJMGER8の造成

Gal4-ERキメラ転写因子発現プラスミドpGERbsrR2を、 $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ になるようにTE緩衝液〔10 mmol/L Tris-HCl(PH8.0)、1 mmol/L エチレンジアミン4酢酸〕に溶解した後、エレクトロポレーション法〔Cytotechnology, 3, 133 (1990)〕により、該プラスミドをNamalwa KJM-1細胞〔Cytotechnology, 1, 151 (1988)〕に、 6×10^6 細胞あたり $4\mu\text{g}$ 導入し、形質転換細胞を得た。Namalwa KJM-1細胞は、EBNA-1遺伝子を発現する無血清馴化したB細胞株である。

該形質転換体を、8mlのRPMI1640・ITPSG培地〔RPMI1640培地(日水製薬社製)に、1/40量の7.5% NaHCO_3 、3% 200mmol/L L-グルタミン溶液(インビトロジェン社製)、0.5% ペニシリン・ストレプトマイシン溶液(インビトロジェン社製、5,000units/ml ペニシリン、5,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ストレプトマイシン)、10mmol/L N-2-ヒドロキシエチルピペラジン- N' -2-エタンスルホン酸 (N-2-hydroxyethylpiperazine- N' -2-hydroxypropane-3-sulfonic acid; HEPES)、3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ インシュリン、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ トランスフェリン、5 mmol/L ビルビン酸ナトリウム、125 nmol/L 亜セレン酸ナトリウム、1 mg/ml ガラクトースを添加した培地〕に懸濁し、 CO_2 インキュベーター中で 37°C で24時間培養した。

培養後、プラストサイジン S (Blastcidin S) (KK-400: 科研製薬社製)を2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように添加し、96穴プレートに分注(500~2000細胞/穴)して培養を行い、pGERbsrR2が染色体DNAに組み込まれた安定形質転換株(シングルクローン)を多数取得した。各形質転換株は、2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のプラストサイジン Sを含むRPMI1640・ITPSG培地で継代した。

下記に示す方法により上記安定形質転換株から、誘導倍率が高く、かつ非誘導時のバックグラウンドが低い優れた安定形質転換株KJMGER8細胞を選択した。

各形質転換株にホタル・ルシフェラーゼの誘導発現プラスミドpAGalSd1-lucを

エレクトロポレーション法により導入し、2日間培養した。培養後、 17β -エストラジオール(E8875:シグマ社製)(終濃度10nmol/L)を添加し、さらに24時間培養後、ホタル・ルシフェラーゼ活性の測定を行った。活性の測定は、ルミノメーターLB953(ベルトールド社製)を用い、細胞溶解用緩衝液〔1%トリトンX-100、100 mmol/L KH₂PO₄ (pH7.8)、1 mmol/Lジチオスレイトール〕100 μ lを、上記培養液に自動注入後、基質溶液〔25 mmol/L グリシルグリシン (pH7.8)、15 mmol/L MgSO₄、5 mmol/L ATP、0.33 mmol/L ルシフェリン〕300 μ lを自動注入し、10秒間の発光量を測定し、ルシフェラーゼ活性とした。比較のために、 17β -エストラジオール無添加条件下でのルシフェラーゼ活性も測定した。

17β -エストラジオール添加条件下のルシフェラーゼ活性と 17β -エストラジオール無添加条件下のルシフェラーゼ活性を比較することにより、遺伝子発現の誘導倍率を算出し、該誘導倍率が高く、且つ 17β -エストラジオール無添加条件下のルシフェラーゼ活性が低いクローンとして、KJMG8細胞を選択した。

(5) KJMG8を宿主としたホタル・ルシフェラーゼ遺伝子の誘導発現

KJMG8にホタル・ルシフェラーゼの誘導発現プラスミドpAGal9-lucまたはコントロールプラスミド(pAGal9-nd)を、エレクトロポレーション法により、 1.6×10^6 細胞あたり4 μ g導入し、形質転換細胞(KJMG8/pAGal9-lucおよびKJMG8/pAGal9-nd)を取得した。

該形質転換細胞を、8mlのRPMI1640・ITPSG培地に懸濁し、CO₂インキュベーター中、37°Cで24時間培養した。培養後、ブラストサイジンS (0.2 μ g/ml) およびジェネティシン (Geneticin; ギブコ社製) (0.5mg/ml) を添加し、さらに14日間培養し、安定形質転換株を取得した。該安定形質転換株は、ブラストサイジンS (0.2 μ g/ml) およびジェネティシン (ギブコ社製) (0.5mg/ml) を含むRPMI1640・ITPSG培地で継代した。

該安定形質転換株に 17β -エストラジオール(E8875:シグマ社製)(終濃度10nmol/L)を添加して24時間培養後、上記と同様にしてルシフェラーゼ活性の測定を行った。比較のために、 17β -エストラジオール無添加条件下でのルシフェラーゼ活性も測定した。

17β -エストラジオール添加条件下のルシフェラーゼ活性と 17β -エストラジオール無添加条件下のルシフェラーゼ活性を比較することにより、遺伝子発現の誘

導倍率を算出した。その結果、KJMGER8/pGal9-lucにおける遺伝子発現の誘導倍率は、約1万倍であった。17 β -エストラジオール無添加条件下でのKJMGER8/pGal9-luc中のルシフェラーゼ活性は非常に低かった（約60RLU/10秒）。この結果は、17 β -エストラジオール無添加条件下ではほとんどルシフェラーゼ遺伝子が発現していないことを示している。

上記のように、pGal9-lucを誘導発現プラスミド、KJMGER8を宿主として用いた系においては、非誘導時のルシフェラーゼ活性が非常に低く、誘導時のルシフェラーゼ活性が非常に高かった。pGal9-lucの構造は、pGal9-ndまたはpGal9-dに誘導発現させるレポーター遺伝子として、ホタル・ルシフェラーゼ遺伝子を挿入した構造である。したがって、KJMGER8を宿主、pGal9-ndまたはpGal9-dを誘導発現ベクターとして用いる系は、非誘導時の遺伝子発現量が非常に低く、かつ遺伝子発現の誘導倍率が高い、極めて優れた誘導発現系であることが判明した。

[実施例19] 新規宿主・ベクター系の開発 (2)

(1) ホタル・ルシフェラーゼをレポーターとするレポータープラスミド pACREplucの造成

cAMP応答配列 (CRE) の制御下にホタル・ルシフェラーゼ遺伝子を発現することのできるレポータープラスミドであるpACREplucを以下の方法で造成した。pACREplucは、ハイグロマイシン耐性遺伝子およびエプスタイン・バー・ウイルスのoriPを有している。

pAMo [J. Biol. Chem., 268, 22782 (1993)、別名pAMoPRC3Sc (特開平05-336963)] をClaIで部分消化し、一カ所切断されたDNA断片を取得した。該DNA断片をMluIで部分消化し、9.5kbのClaI-MluI断片を取得した。pAGE248 [J. Biol. Chem., 269, 14730 (1994)] をClaIおよびMluIで切断し、ハイグロマイシン耐性遺伝子を含む1.5kbのClaI-MluI断片を取得した。pAMo由来のClaI-MluI断片、およびpAGE248由来のClaI-MluI断片を結合し、プラスミドpAMohを造成した。

pAMohをXhoIとHindIIIで切断後、ハイグロマイシン耐性遺伝子を含むXhoI-HindIII断片を取得した。pGal9-lucをSalIとHindIIIで切断し、oriP、Gal4UASを含むSalI-HindIII断片を取得した。pGal9-luc由来のSalI-HindIII断片、および上記pAMoh由来のXhoI-HindIII断片を結合することにより、プラスミドpGal9hを

造成した。

pBluescriptII KS+ (ストラタジーン社製) を SalI および XhoI で切断した後、フォスファターゼ (Alkaline Phosphatase E.coli C75、宝酒造社製) を用いて脱リン酸化処理し、アンピシリン耐性遺伝子を含む SalI-XhoI 断片を取得した。配列番号91および92で表される塩基配列を有す合成オリゴヌクレオチドをアニールさせることにより、CRE配列を2つ含む二本鎖DNAを調製した。該二本鎖DNAとpBluescriptII KS+由来の上記SalI-XhoI 断片を結合し、CRE配列を2つ含むプラスミドpBS-CREIを造成した。pBS-CREIは、該二本鎖DNAが、SalI切断部位およびXhoI切断部位が再生する方向に組み込まれたプラスミドであり、上記切断部位をそれぞれ1つ有している。

pBS-CREIを ScaI および XhoI で切断しファージf1のoriを含む ScaI-XhoI断片を取得した。pBS-CREIを ScaI および SalI で切断しColE1 oriを含む ScaI-SalI断片を取得した。pBS-CREI由来の ScaI-XhoI断片および ScaI-SalI断片を結合し、CRE配列を4つ含むpBS-CREIIを造成した。

pBS-CREIIを ScaI および XhoI で切断しファージf1のoriを含む ScaI-XhoI断片を取得した。pBS-CREIIを ScaI および SalI で切断しColE1 oriを含む ScaI-SalI断片を取得した。pBS-CREII由来の ScaI-XhoI断片および ScaI-SalI断片を結合し、CRE配列を8つ含むpBS-CREIVを造成した。

pBS-CREIVを ScaI および XhoI で切断しファージf1のoriを含む ScaI-XhoI断片を取得した。pBS-CREIVを ScaI および SalI で切断しColE1 oriを含む ScaI-SalI断片を取得した。pBS-CREIV由来の ScaI-XhoI断片および ScaI-SalI断片を結合し、CRE配列を16含むpBS-CREVIIIを造成した。

pBS-CREVIIIを XhoI で切断後、Klenow処理し、さらに HindIII で切断することにより、16個のCREを含む HindIII-XhoI (平滑末端) 断片を取得した。pGalSd1を MluI と HindIII で切断し、1.4kbの MluI-HindIII断片を取得した。pGal9hを XbaI で切断後、Klenow処理し、さらに MluI で切断することにより XbaI (平滑末端) -MluI断片を取得した。pBS-CREVIII由来の HindIII-XhoI (平滑末端) 断片、pGalSd1由来の MluI-HindIII断片、およびpGal9h由来の XbaI (平滑末端) -MluI断片を結合し、プラスミドpACREhを作製した。

pGal9-lucを XhoI と NotI で切断し、ホタル・ルシフェラーゼ遺伝子を含む XhoI-

NotI断片を取得した。pACREhをXhoIとNotIで切断し、CRE配列を含むXhoI-NotI断片を取得した。pGal9-luc由来のXhoI-NotI断片、およびpACREh由来のXhoI-NotI断片を結合することによりプラスミドpACRElucを作製した。

pACRElucをHindIIIで切断後、Klenow処理し、さらにXhoIで切断することによりCREを含むHindIII（平滑末端）-XhoI断片、およびホタル・ルシフェラーゼ遺伝子を含むHindIII（平滑末端）-XhoI断片をそれぞれ取得した。pACREluc由来の上記2種のHindIII（平滑末端）-XhoI断片を結合することにより、pACREluc中のCRE配列上流のHindIIIサイトが消失したプラスミドpACRElucHを作製した。

pGL3-Enhancer vector〔プロメガ(Promega)社製〕をHindIIIとHpaIで切断し、luc+遺伝子（改変型のホタル・ルシフェラーゼ遺伝子）を含むHindIII-HpaI断片を取得した。pACRElucHをNotIで切断後、Klenow処理し、さらにHindIIIで切断することにより、CREを含むHindIII-NotI（平滑末端）断片を取得した。pGL3-Enhancer vector由来のHindIII-HpaI断片、およびpACRElucH由来のHindIII-NotI（平滑末端）断片を結合することによりプラスミドpACREplucを作製した。

(2) レポータープラスミドpACREplucを導入したNamalwa KJM-1細胞の造成

レポータープラスミドpACREplucを、 $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ になるようにTE緩衝液に溶解した後、該プラスミドを、エレクトロポレーション法〔Cytotechnology, 3, 133 (1990)〕によりNamalwa KJM-1細胞に、 6×10^6 細胞あたり $4\mu\text{g}$ 導入し、形質転換細胞を得た。

該形質転換細胞を8mlのRPMI1640・ITPSG培地に懸濁し、CO₂インキュベーター中、37°Cで24時間培養した。培養後、ハイグロマイシンB (Hygromycin B) ($300\mu\text{g}/\text{ml}$)を添加し、さらに14日間培養して安定形質転換株を取得した。該形質転換株は、ハイグロマイシンB ($300\mu\text{g}/\text{ml}$)を含むRPMI1640・ITPSG培地で継代した。

CREを介した遺伝子発現が起こるかどうかを確認するために、該形質転換株を、2a型のアデノシン受容体 (A2a) のアゴニストである5'-N-エチルカルボキサミドアデノシン (NECA: シグマ社製)、アデニレートシクラーゼの活性剤であるフォルスコリン (シグマ社製)、またはカルシウムイオノフォアであるA23187〔リサーチ・バイオケミカル・インターナショナル (Research Biochemicals International) 社製〕を用いて、下記条件で刺激した。

即ち、上記安定形質転換株を48穴プレート1穴あたり 1×10^5 細胞ずつ分注し、

NECA (終濃度100nmol/L)、フォルスコリン (終濃度100 μ mol/L)、またはA23187 (終濃度10 μ mol/L) を添加後、CO₂インキュベーター中で5時間培養し、刺激した。刺激後、実施例18の(4)に記載の方法を用いてホタル・ルシフェラーゼ活性測定をおこなった。

その結果、NECA刺激で約7倍、フォルスコリン刺激で約10倍のホタル・ルシフェラーゼ活性の上昇がみられた。一方、A23187刺激ではホタル・ルシフェラーゼ活性はほとんど変化しなかった。

以上の結果から、pACREplucを導入したNamalwa KJM-1細胞においては、CREからの転写を促す刺激により、ルシフェラーゼ遺伝子が発現することが明らかになった。

即ち、pACREplucを導入したNamalwa KJM-1細胞を用いることにより、CREからの転写を促す活性を有する物質を探索することが可能である。

pACREplucを導入したNamalwa KJM-1細胞をNECAで刺激し、6、24、48、72、および96時間後にホタル・ルシフェラーゼ活性を測定した結果、6時間で活性が最大となり、24時間でほぼ半減した。従って、該細胞を任意の物質で刺激する場合は、刺激後6時間目に活性を測定することが好ましいと考えられた。

(3) レポータープラスミドpACREplucをKJMGER8の染色体DNAに組み込んだ安定形質転換株の造成

pACREpluc中のoriP内に1個所存在する制限酵素であるHpaI、SpeI、またはBclIで切断したpACREplucを1 μ g/ μ lになるようにTE緩衝液に溶解した後、エレクトロポレーション法〔Cytotechnology, 3, 133 (1990)〕により、実施例18で造成したKJMGER8に、6 \times 10⁶細胞あたり4 μ g導入し、形質転換細胞を得た。

該形質転換細胞を8mlのRPMI1640・ITPSG培地に懸濁し、CO₂インキュベーター中、37°Cで24時間培養した。培養後、プラストサイジンS (2.0 μ g/ml) およびハイグロマイシンB (300 μ g/ml) を添加し、さらに7日間培養した。生細胞数を確認後、プラストサイジンS (2.0 μ g/ml) およびハイグロマイシンB (300 μ g/ml) およびKJMGER8を1 \times 10⁵細胞/mlを含むRPMI1640・ITPSG培地で、150細胞/mlになるように希釈し、96穴プレートに分注 (平均30細胞/穴) して培養を行い、実際に1穴当たり1コロニーを形成した穴を選択し、420個の安定形質転換株 (シングルクローン) を取得した。各形質転換株は、プラストサイジンS (2.0 μ g/ml) およびハイグ

ロマイシンB (300 μ g/ml) を含むRPMI1640・ITPSG培地で継代した。

(4) 優れた性質を有する安定形質転換株 (シングルクローン) の選択

上記 (3) で取得した各クローンを96穴プレートにまき (1~2 $\times 10^4$ 細胞/穴)、NECA (終濃度100nmol/L) を添加してCO₂インキュベーター中で6時間培養した。培養後、実施例18の (4) に記載の方法を用いて各穴のホタル・ルシフェラーゼ活性を測定した。測定器としてはMicro Lumat LB96P (ベルトールド社製) を使用した。活性の高かった17クローンを選択した。

該17クローンを用い、上記 (2) と同様の方法でNECA刺激し、NECA刺激しない場合と比較し、ルシフェラーゼ活性が60倍以上上昇した8クローンを選択した。該8クローンをそれぞれGBC1~GBC8と命名した。

該8クローンにpAGal9-GPR12 [構成活性型のG蛋白質共役型受容体であるGPR12を誘導発現するためのプラスミド：下記実施例22参照] を、上記エレクトロポレーション法により、6 $\times 10^6$ 細胞あたり4 μ g導入し、形質転換細胞を取得した。

該形質転換細胞を8mlのRPMI1640・ITPSG培地に懸濁し、CO₂インキュベーター中、37°Cで24時間培養した。培養後、プラストサイジンS (2.0 μ g/ml)、ハイグロマイシンB (300 μ g/ml) およびジェネティシン (500 μ g/ml) を添加し、さらに14日間培養して安定形質転換株を取得した。該形質転換株は、プラストサイジンS (2.0 μ g/ml)、ハイグロマイシンB (300 μ g/ml) およびジェネティシン (500 μ g/ml) を含むRPMI1640・ITPSG培地で継代した。

各形質転換株に17 β -エストラジオール (終濃度10nmol/L) を添加して24時間培養後、実施例18の (4) と同様の方法によりルシフェラーゼ活性を測定した。比較のために、17 β -エストラジオール無添加条件下でのルシフェラーゼ活性も測定した。

17 β -エストラジオールを添加した際のルシフェラーゼ活性の上昇率が高かった3クローン (GBC5、GBC6、GBC7) を選択した。GBC5、GBC6、GBC7における該上昇率は、それぞれ56、193、および364倍であった。

該3クローンに、上記と同様の方法でpAGal9-V2 [2型バソプレッシン受容体 (V2) を誘導発現するためのプラスミド：下記実施例21の (1) 参照] を導入して安定形質転換株を取得し、17 β -エストラジオール刺激により導入遺伝子 (V2遺伝子) を誘導発現させた後に、バソプレッシン刺激した際のルシフェラーゼ活性を

調べた。同時に、 17β -エストラジオール1刺激しない場合の活性、およびバソプレッシン刺激しない場合の活性を調べた。

以上の結果、 17β -エストラジオールで刺激した時にのみバソプレッシンに反応して高いルシフェラーゼ活性 (599倍) を示したGBC7を優良株として選択した。

(5) ウミシイタケ・ルシフェラーゼをレポーターとするレポータープラスミド pACRElucの造成

pRL-SV40 vector (プロメガ社製) を XbaI で切断し、Klenow処理後、さらに HindIII で切断し、ウミシイタケ・ルシフェラーゼ遺伝子を含む HindIII-XbaI (平滑末端) 断片を取得した。上記 (1) で構築した pACRElucH を NotI で切断後、Klenow処理し、さらに HindIII で切断することにより CRE を含む HindIII-NotI (平滑末端) 断片を取得した。pRL-SV40 vector 由来の HindIII-XbaI (平滑末端) 断片、および pACRElucH 由来の HindIII-NotI (平滑末端) 断片を結合することによりプラスミド pACREluc を造成した。

(6) レポータープラスミド pACREluc を KJMGER8 の染色体 DNA に組み込んだ安定形質転換株の造成

上記 (3) で記載した方法に準じて、pACREluc を KJMGER8 に導入し、96 個の安定形質転換株 (シングルクローン) を取得した。各形質転換株は、ブラストサイジン S ($2.0\mu\text{g/ml}$) およびハイグロマイシン B ($300\mu\text{g/ml}$) を含む RPMI1640・ITPSG 培地で継代した。

(7) 優れた性質を有する安定形質転換株 (シングルクローン) の選択

ホタル・ルシフェラーゼの活性を測定する代わりにウミシイタケ・ルシフェラーゼの活性を測定する以外は、上記 (4) に記載した方法に準じ、上記 (6) で取得したクローンの中から優れた性質を有するクローンの選択を行った。

上記 (6) で取得した各クローンを 96 穴プレートにまき ($1\sim 2\times 10^4$ 細胞/穴)、NECA (終濃度 100nmol/L) を添加して CO_2 インキュベーター中で 6 時間培養した。その後、セレンテラジン h (モレキュラー・プロブズ社) (終濃度 250nmol/L) を添加してウミシイタケ・ルシフェラーゼ活性を測定した。活性測定には、Wallac 1420 ARVOsx マルチラベルカウンタ (ワラック・ベルトールド・ジャパン社製) を用いた。活性の高かった 9 クローンを選択した。該 9 クローンをそれぞれ GBCR1~GBCR9 と命名した。

該9クローンについて、NECA刺激し、NECA刺激しない時と比較し、ウミシイタケ・ルシフェラーゼ活性が18倍以上上昇した2クローンを選択した。該2クローンをそれぞれGBCR1およびGBCR2と命名した。

該2クローンにpAGal9-GPR12を導入し、安定形質転換株を取得した。該形質転換株を17 β -エストラジオールで24時間刺激後、ウミシイタケ・ルシフェラーゼ活性を測定した。比較のために、17 β -エストラジオール無添加条件下でのウミシイタケ・ルシフェラーゼ活性も測定した。17 β -エストラジオールを添加した際のウミシイタケ・ルシフェラーゼ活性の上昇率が高かった1クローン（GBCR2）を優良株として選択した。該上昇率は364倍であった。

GBCR2にpAGal9-V2を導入し、安定形質転換株を取得した。該形質転換株を、17 β -エストラジオールで刺激し、導入V2遺伝子を誘導発現させた後に、バソプレッシンで刺激し、刺激後のウミシイタケ・ルシフェラーゼ活性を測定した。同時に、17 β -エストラジオール刺激しない場合の活性、およびバソプレッシン刺激しない場合の活性を調べた。結果を第10図に示した。

GBCR2を宿主細胞とした場合、17 β -エストラジオールで刺激した時にのみバソプレッシンに反応し、GBCR1を用いた場合よりも、高いウミシイタケ・ルシフェラーゼ活性（139倍）を示し、この系においてGBCR2が優れていることがわかった。

〔実施例20〕新規宿主・ベクター系の開発（3）

（1）G α_{s4} の発現プラスミドpAMoh-Gs4の構築

実施例6に記載の方法に準じ、Namalwa KJM-1由来の全RNA(5 μ g)から一本鎖cDNAを調製した。上記一本鎖cDNA（10 μ l）に、G α_{s4} 遺伝子特異的プライマー（各20pmol）、2.5nmol/l dNTP混合液を4 μ l、DMSOを2.5 μ l、5単位/ μ l Pyrobest DNA Polymerase（宝酒造社製）を0.25 μ l、10 \times 反応緩衝液（宝酒造社製）を5 μ l添加し、滅菌水を加えて全量を50 μ lに調製した。配列番号93および94に記載した配列を有する合成DNAをG α_{s4} 遺伝子特異的プライマーとして用いた。これらプライマーには、それぞれHindIIIサイトおよびAsp718サイトが導入されている。サーマルサイクラーDNA Engine（MJ Research社製）を用い、95 $^{\circ}$ Cで5分間処理した後、94 $^{\circ}$ Cで30秒間、65 $^{\circ}$ Cで1分間、72 $^{\circ}$ Cで2分間からなる反応を30サイクルの条件でPCRを行った。

PCRにより増幅されたDNA断片をアガロースゲル電気泳動法により回収した。該増幅断片をHindIIIおよびAsp718で切断し、HindIII-Asp718断片を取得した。プラスミドpAMohをHindIIIおよびAsp718で切断後、HindIII-Asp718断片を取得した。PCR断片由来のHindIII-Asp718断片、およびpAMoh由来のHindIII-Asp718断片を結合することにより、 $G\alpha_{s4}$ の発現プラスミドpAMoh-Gs4を造成した。

(2) プラスミドpAMoh-Gs-qの造成

上記(1)で構築したpAMoh-Gs4をXbaIとAsp718で切断することによりoriPを含むXbaI-Asp718断片を取得した。また、pAMoh-Gs4をXbaIで切断後、SphIで部分消化することにより、C末端を欠失した $G\alpha_{s4}$ をコードするXbaI-SphI断片を取得した。配列番号95および96で表される塩基配列を有する合成DNAをT4ポリヌクレオチドキナーゼでリン酸化後、アニールさせることにより、 $G\alpha_q$ のC末端5アミノ酸をコードする領域を含む二本鎖DNAを取得した。該二本鎖DNA、pAMoh-Gs4由来のXbaI-Asp718断片およびXbaI-SphI断片を結合することにより、pAMoh-Gs-qを造成した。

(3) プラスミドpAMoh-Gs-iの造成

配列番号97および98で表される塩基配列を有する合成DNAをT4ポリヌクレオチドキナーゼでリン酸化後、アニールさせることにより、 $G\alpha_i$ のC末端5アミノ酸をコードする領域を含む二本鎖DNAを取得した。該二本鎖DNA、上記(2)で取得したpAMoh-Gs4由来のXbaI-Asp718断片、およびpAMoh-Gs4由来のXbaI-SphI断片を結合することにより、pAMoh-Gs-iを造成した。

(4) プラスミドpAMopGs-qMoGs-iの造成

pACRElucをClaIで切断後、Klenow処理し、さらにCpoIで切断することにより、oriPおよびCRE-ホタル・ルシフェラーゼ遺伝子部分を含むCpoI-ClaI (平滑末端)断片を取得した。pAMoh-Gs-iをBssHIIおよびCpoIで切断し、 $G\alpha_{s-i}$ をコードするBssHII-CpoI断片を取得した。pAGE248 [J. Biol. Chem. 269, 14730 (1994)] をXhoIで切断後、Klenow処理し、さらにBssHIIで切断し、モロニー・マウス白血病ウイルスのLTRプロモーター〔以下、Moプロモーターと略する場合がある〕配列の一部を含むXhoI (平滑末端)-BssHII断片を取得した。pACREluc由来のCpoI-ClaI (平滑末端)断片、pAMoh-Gs-i由来のBssHII-CpoI断片、pAGE248由来のXhoI (平滑末端)-BssHII断片を結合し、プラスミドpACRElucMoGs-iを造成した。

pAMoh-Gs-qをBssHIIおよびCpoIで切断し、 $G\alpha_{s-q}$ をコードするBssHII-CpoI断片

を取得した。pAMoh-Gs-i由来のBssHII-CpoI断片、および上記で取得したpACREluc由来のCpoI-ClaI (平滑末端)断片、pAGE248由来のXhoI (平滑末端)-BssHII断片を結合し、プラスミドpACRElucMoGs-qを造成した。

pACRElucMoGs-iを、NaeIおよびBssHIIで切断しMoプロモーターを含むNaeI-BssHII断片を、CpoIおよびBssHIIで切断し $G\alpha_{s-i}$ をコードするCpoI-BssHII断片を、それぞれ取得した。pACRElucMoGs-qを、NheIおよびCpoIで切断しCRE-ホタル・ルシフェラーゼ遺伝子を含むNheI-CpoI断片を、NheIおよびNaeIで切断し $G\alpha_{s-q}$ をコードするNheI-NaeI断片を、それぞれ取得した。pACRElucMoGs-i由来のNaeI-BssHII断片およびCpoI-BssHII断片、ならびにpACRElucMoGs-q由来のNheI-CpoI断片およびNheI-NaeI断片の4断片を結合し、プラスミドpACRElucMoGs-qMoGs-iを造成した。

pACRElucMoGs-qMoGs-iプラスミドをSalIおよびNotIで消化後、Klenow処理し、SalI (平滑末端)-NotI (平滑末端)断片を取得した。該断片をセルフライゲーションすることにより、pACRElucMoGs-qMoGs-iからCREレポーターユニットを除去したプラスミドpAMohGs-qMoGs-iを造成した。

pAMohGs-qMoGs-iをCpoIで切断後、Klenow処理し、さらにAseIで切断することにより、ハイグロマイシン耐性遺伝子を含まないCpoI(平滑末端化)-AseI断片を取得した。pPUR (クロンテック社製; Genbank Accession番号U07648) をBamHIで切断後、Klenow処理し、さらにAseIで切断することにより、ピューロマイシン耐性遺伝子を含むBamHI (平滑末端)-AseI断片を取得した。pPUR由来のBamHI (平滑末端)-AseI断片、および上記pAMohGs-qMoGs-i由来のCpoI(平滑末端化)-AseI断片を結合し、pAMohGs-qMoGs-i中のハイグロマイシン耐性遺伝子を、ピューロマイシン耐性遺伝子で置き換えたpAMopGs-qMoGs-iを造成した。

(5) プラスミドpAMopGs-qMoGs-iをGBC7の染色体DNAに組み込んだ安定形質転換株の造成

pAMopGs-qMoGs-i中のoriP内に1個所存在する制限酵素であるSpeIで切断したpAMopGs-qMoGs-iを $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ になるようにTE緩衝液に溶解した後、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)] により上記実施例19の(4)で造成したGBC7に、 6×10^6 細胞あたり $4\mu\text{g}$ 導入し、形質転換細胞を得た。

該形質転換細胞を、8mlのRPMI1640・ITPSG培地に懸濁し、CO₂インキュベーター

中、37°Cで24時間培養した。培養後、ブラストサイジンS (2.0 μ g/ml)、ハイグロマイシンB (300 μ g/ml)、およびピューロマイシン (puromycin; シグマ社製) (0.2 μ g/ml) を添加し、さらに7日間培養した。培養後、該形質転換株の生細胞数を確認し、ブラストサイジンS (2.0 μ g/ml)、ハイグロマイシンB (300 μ g/ml)、ピューロマイシン (0.2 μ g/ml)、およびKJMG8 (1 \times 10⁶細胞/ml) を含むRPMI1640・ITPSG培地で、該形質転換株が150細胞/mlになるように希釈し、96穴プレートに分注 (30細胞/穴) して培養を行い、93個の安定形質転換株 (シングルクローン) を取得した。各形質転換株は、ブラストサイジンS (2.0 μ g/ml)、ハイグロマイシンB (300 μ g/ml)、およびピューロマイシン (0.2 μ g/ml) を含むRPMI1640・ITPSG培地で継代した。

(6) 優れた性質を有する安定形質転換株 (シングルクローン) の選択

上記 (5) で取得した93クローンを96穴プレートにまき (1~2 \times 10⁴細胞/穴)、LipofectAMINE 2000 (ギブコ社製) を用いて、pGal9-AT1 [下記実施例21の (3) 参照] を各クローンに導入し、形質転換細胞を取得した。遺伝子導入の具体的方法はリポフェクトアミン2000の説明書に従って行い、1穴当たりプラスミドを0.3 μ g、リポフェクトアミン2000を0.8 μ l使用した。

該形質転換細胞を1日培養した後に、ハイグロマイシンB (300 μ g/ml)、ブラストサイジンS (2.0 μ g/ml)、ピューロマイシン (0.2 μ g/ml)、およびジェネティシン (0.5mg/ml) を添加し、37°Cで7日間培養した。各穴へ17 β -エストラジオール (終濃度10nmol/L) を添加し、さらに1日間培養した。各穴へアンジオテンシンII (ペプチド研究所社製) (終濃度100nmol/L) を添加し、6時間培養後、実施例19の (4) の方法を用いてホタル・ルシフェラーゼ活性を測定した。同時に、アンジオテンシンII刺激しない場合の活性を調べた。以上の結果、アンジオテンシンIIに反応して高いホタル・ルシフェラーゼ活性を示した10クローンを選択した。

該10クローンに、pGal9-AT1を上記エレクトロポレーション法により、6 \times 10⁶細胞あたり4 μ g導入し、形質転換細胞を取得した。

該形質転換細胞を8mlのRPMI1640・ITPSG培地に懸濁し、CO₂インキュベーター中、37°Cで24時間培養した。培養後、ブラストサイジンS (2.0 μ g/ml)、ハイグロマイシンB (300 μ g/ml)、ピューロマイシン (0.2 μ g/ml)、およびジェネティシン (500 μ g/ml) を添加し、さらに14日間培養して安定形質転換株を取得した。該形

質転換株は、ブラストサイジンS ($2.0\mu\text{g/ml}$)、ハイグロマイシンB ($300\mu\text{g/ml}$)、ピューロマイシン ($0.2\mu\text{g/ml}$)、およびジェネティシン ($500\mu\text{g/ml}$) を含むRPMI1640・ITPSG培地で継代した。

各形質転換株に 17β -エストラジオール (終濃度 10nmol/L) を添加して24時間培養後、アンジオテンシンII (終濃度 100nmol/L) を添加し、さらに6時間培養後、上記の方法を用いてホタル・ルシフェラーゼ活性を測定した。同時に、 17β -エストラジオール刺激しない場合の活性、およびアンジオテンシンII刺激しない場合の活性を測定した。 17β -エストラジオールで刺激した時にのみアンジオテンシンIIに反応して高いホタル・ルシフェラーゼ活性 (85倍) を示したGBCC13を優良株として選択した。

(7) プラスミドpAMopGs-qMoGs-iをGBCR2の染色体DNAに組み込んだ安定形質転換株の造成

上記 (5) で記載した方法を用いて、pAMopGs-qMoGs-iをGBCR2に導入することにより、94個の安定形質転換株 (シングルクローン) を取得した。各形質転換株は、ブラストサイジンS ($2.0\mu\text{g/ml}$)、ハイグロマイシンB ($300\mu\text{g/ml}$)、およびピューロマイシン ($0.2\mu\text{g/ml}$) を含むRPMI1640・ITPSG培地で継代した。

(8) 優れた性質を有する安定形質転換株 (シングルクローン) の選択

上記 (7) で取得したクローンの中から優れた性質を有するクローンの選択を行った。ホタル・ルシフェラーゼの活性を測定する代わりにウミシイタケ・ルシフェラーゼの活性を測定する以外は、上記 (6) に記載した方法に準じた。ウミシイタケ・ルシフェラーゼの活性は、実施例19の (7) に記載した方法に準じて測定した。

上記 (7) で取得した各クローンにpAGal9-AT1を導入し、形質転換細胞を取得した。各形質転換細胞を 17β -エストラジオールで処理後、アンジオテンシンIIで刺激してウミシイタケ・ルシフェラーゼ活性を測定した。同時に、アンジオテンシンII刺激しない場合の活性を測定した。アンジオテンシンIIに反応して高いウミシイタケ・ルシフェラーゼ活性を示した13クローンを選択した。

該13クローンにpAGal9-AT1をエレクトロポレーション法により導入し、形質転換細胞を取得した。各形質転換細胞を 17β -エストラジオールで処理後、アンジオテンシンIIで刺激してウミシイタケ・ルシフェラーゼ活性を測定した。同時に、

17 β -エストラジオール刺激しない場合の活性、およびアンジオテンシンII刺激しない場合の活性を測定した。17 β -エストラジオールで刺激した時にのみアンジオテンシンIIに反応して高いウミシイタケ・ルシフェラーゼ活性（132倍）を示したGBCRC6を優良株として選択した。

【実施例21】 任意のGPCRからのシグナルを検出するためのアッセイ細胞の構築と利用

(1) 2型バソプレッシン受容体 (V2) からのシグナルを検出するためのアッセイ細胞の構築と利用

鋳型として、ヒト腎臓由来のmRNA (1 μ g; クロンテック社製) から調製した一本鎖cDNAを、V2遺伝子特異的プライマーとして、配列番号99および100に記載した配列を有する合成DNAを用い、PCRによりV2遺伝子を取得した。V2遺伝子特異的プライマーには、それぞれHindIIIサイトおよびAsp718サイトが導入されている。

得られたV2遺伝子増幅断片をHindIIIおよびAsp718で切断し、HindIII-Asp718断片を取得した。プラスミドpAGal9-dをHindIIIおよびAsp718で切断し、HindIII-Asp718断片を取得した。上記V2遺伝子増幅断片由来のHindIII-Asp718断片、およびpAGal9-d由来のHindIII-Asp718断片を結合することにより、V2の誘導発現プラスミドpAGal9-V2を造成した。

pAGal9-V2を1 μ g/ μ lになるようにTE緩衝液に溶解した後、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)] によりGBCRC6に、 1.6×10^6 細胞あたり4 μ g導入し、形質転換細胞を得た。

該形質転換細胞を8mlのRPMI1640・ITPSG培地に懸濁し、CO₂インキュベーター中、37°Cで24時間培養した。培養後、ハイグロマイシンB (0.3mg/ml)、プラストサイジンS (0.2 μ g/ml)、ピューロマイシン (0.2 μ g/ml)、およびジェネティシン (0.5mg/ml) を添加し、さらに14日間培養して安定形質転換株を取得した。該形質転換株は、ハイグロマイシンB (0.3mg/ml)、プラストサイジンS (0.2 μ g/ml)、ピューロマイシン (0.2 μ g/ml)、およびジェネティシン (0.5mg/ml) を含むRPMI1640・ITPSG培地で継代した。

17 β -エストラジオール (終濃度10nmol/L) で24時間刺激後、各種濃度のバソプレッシン (Arg8-Vasopressin; Peptide Institute社製) を添加し、6時間後にウ

ミシイタケ・ルシフェラーゼ活性を測定した。結果を第11図に示した。

本アッセイ系を用いることにより、 $G\alpha_s$ に共役するV2からのシグナルを、高感度、高シグナル／ノイズ比で検出できることが明らかになった。本アッセイ系を用いて、V2のアゴニストまたはアンタゴニストを探索することができる。

(2) 1型コルチコトロピン放出ホルモン受容体 (CRHR-1) からのシグナルを検出するためのアッセイ細胞の構築と利用

ヒト視床下部由来のmRNA (1 μ g; クロンテック社製) から調製した一本鎖cDNAを、CRHR-1遺伝子特異的プライマーとして、配列番号101および102に記載した配列を有する合成DNAを用い、PCRによりCRHR-1遺伝子を取得した。CRHR-1遺伝子特異的プライマーには、それぞれHindIIIサイトおよびNotIサイトが導入されている。

得られたCRHR-1遺伝子増幅断片をHindIIIおよびNotIで切断し、HindIII-NotI断片を取得した。プラスミドpGal9-dをHindIIIおよびNotIで切断し、HindIII-NotI断片を取得した。上記CRHR-1遺伝子増幅断片由来のHindIII-NotI断片、およびpGal9-d由来のHindIII-NotI断片を結合することにより、CRHR-1の誘導発現プラスミドpGal9-CRHR1を造成した。

上記(1)に記載の方法に準じ、pGal9-CRHR1をGBCRC6に導入し、安定形質転換株を取得した。該形質転換株を17 β -エストラジオール (終濃度10nmol/L) で24時間刺激後、各種濃度のヒトコルチコトロピン放出ホルモン (ペプチド研究所社製) を添加し、6時間後にウミシイタケ・ルシフェラーゼ活性を測定した。結果を第12図に示した。

本アッセイ系を用いることにより、 $G\alpha_s$ に共役するCRHR-1からのシグナルを、高感度、高シグナル／ノイズ比で検出できることが明らかになった。本アッセイ系を用いて、CRHR-1のアゴニストまたはアンタゴニストを探索することができる。

(3) 1型アンジオテンシンII受容体 (AT1) からのシグナルを検出するためのアッセイ細胞の構築と利用

プラスミドpAR1.8 [Nature, 351, 230 (1991)] をHindIIIおよびNotIで切断し、ウシAT1遺伝子を含むHindIII-NotI断片を取得した。pGal9-lucをHindIIIおよびNotIで切断し、ホタル・ルシフェラーゼ遺伝子を含まないHindIII-NotI断片を取得した。pAR1.8由来のHindIII-NotI断片、およびpGal9-luc由来のHindIII-NotI断片を結合し、pGal9-AT1を造成した。

上記(1)に記載の方法に準じ、pAGal9-AT1をGBCRC6に導入し、安定形質転換株を取得した。該形質転換株を 17β -エストラジオール(終濃度10nmol/L)で24時間刺激後、各種濃度のヒト・アンジオテンシンII(human Angiotensin II; BACHEM社製)を添加し、6時間後にウミシイタケ・ルシフェラーゼ活性を測定した。結果を第13図に示した。

本アッセイ系を用いることにより、 $G\alpha_q$ または $G\alpha_i$ に共役するAT1からのシグナルを、高感度、高シグナル/ノイズ比で検出できることが明らかになった。本アッセイ系を用いて、AT1のアゴニストまたはアンタゴニストを探索することができる。

(4) 1型ブラジキニン受容体(B1)からのシグナルを検出するためのアッセイ細胞の構築と利用

鋳型として、ヒト染色体DNA(40ng; クロンテック社製)を、B1遺伝子特異的プライマーとしては、配列番号103および104に記載した配列を有する合成DNAを用い、PCRによりB1遺伝子を取得した。B1遺伝子特異的プライマーには、それぞれHindIIIサイトおよびAsp718サイトが導入されている。

得られたB1遺伝子増幅断片をHindIIIおよびAsp718で切断し、HindIII-Asp718断片を取得した。プラスミドpAGal9-dをHindIIIおよびAsp718Iで切断し、HindIII-Asp718断片を取得した。上記B1遺伝子増幅断片由来のHindIII-Asp718断片、およびpAGal9-d由来のHindIII-Asp718断片を結合することにより、B1の誘導発現プラスミドpAGal9-B1を造成した。

上記(1)に記載の方法に準じ、pAGal9-B1をGBCRC6に導入し、安定形質転換株を取得した。該形質転換株を 17β -エストラジオール(終濃度10nmol/L)で24時間刺激後、各種濃度のDes-Arg9-ブラジキニン(ペプチド研究所社製)を添加し、6時間後にウミシイタケ・ルシフェラーゼ活性を測定した。結果を第14図に示した。

本アッセイ系を用いることにより、 $G\alpha_q$ に共役するB1からのシグナルを、高感度、高シグナル/ノイズ比で検出できることが明らかになった。本アッセイ系を用いて、B1のアゴニストまたはアンタゴニストを探索することができる。

(5) 5型ソマトスタチン受容体(sst5)からのシグナルを検出するためのアッセイ細胞の構築と利用

上記(1)に記載の方法に準じ、プラスミドpAGal9-sst5〔下記実施例23の(2)〕

参照]をGBCRC6に導入し、安定形質転換株を取得した。該形質転換株を 17β -エストラジオール（終濃度10nmol/L）で24時間刺激後、各種濃度のヒト・ソマトスタチン（ペプチド研究所社製）を添加し、6時間後にウミシイタケ・ルシフェラーゼ活性を測定した。結果を第15図に示した。

本アッセイ系を用いることにより、 $G\alpha_i$ に共役するsst5からのシグナルを、高感度、高シグナル／ノイズ比で検出できることが明らかになった。本アッセイ系を用いて、sst5のアゴニストまたはアンタゴニストを探索することができる。

上記方法により、 $G\alpha_s$ 、 $G\alpha_q$ 、または $G\alpha_i$ と共役する任意のGPCRからのシグナルを検出するための優れたアッセイ細胞を構築することができた。該細胞を用いて、特定のGPCRのアゴニストまたはアンタゴニストを探索することができる。

[実施例22] 新規宿主・ベクター系を用いた構成活性型GPCRの同定と利用

(1) 各種GPCRの誘導発現プラスミドの造成

鋳型として、各種ヒト臓器由来のmRNA（クロンテック社製）から調製した一本鎖cDNA（5 μ l）またはヒト染色体DNA（100ng；クロンテック社製）を、各種GPCR遺伝子特異的プライマーとして下記第8-1表及び第8-2表中に記載した配列番号の配列を有する合成DNAを用い、PCRにより各種GPCR遺伝子を取得した。酵素としては、TaKaRa ExTaq（宝酒造社製）、Pyrobest DNA Polymerase（宝酒造社製）、KOD DNA Polymerase（TOYOBO社製）、PfuTurbo DNA Polymerase（stratagene社製）、Herculase Enhanced DNA Polymerase（stratagene社製）、またはPLATINUM Pfx DNA Polymerase（ギブコ社製）を用いた。PCRを行う際の緩衝液としては、使用する酵素に付加された10倍濃度の緩衝液を使用した。PCRは、サーマルサイクラーDNA Engine（MJ Research社製）を用い、95°Cで5分間の処理後、94°Cで1分間、アニール温度（55、60、62、または65°C）で1分間、72°Cで1分間からなる反応を25～35サイクル行った。

増幅された各種GPCR遺伝子断片をそれぞれのクローニングに用いたプライマー上に設計された配列を切断する制限酵素（たとえばHindIII-NotI）で切断した。GPCR遺伝子を含む断片をアガロースゲル電気泳動法により回収した。該切断断片を、プラスミドpAGal9-ndの対応する制限酵素サイト（たとえばHindIII-NotI）間へ組み込むことにより、誘導発現プラスミドを構築した。下記実施例23の（2）に

記載した方法に準じて、プラスミドに組み込んだDNA断片の配列を決定し、目的のGPCRをコードしていることを確認した。

OGR1に関しては、PCRエラーの結果、221番目のセリンがアスパラギンに置換した変異体（OGR1S221Nと呼ぶ）も取得された。OGR1S221Nのアミノ酸配列を配列番号187に示した。該変異体を発現するプラスミドをpGal9-OGR1S221Nと呼ぶ。

(2) 構成活性型GPCRの同定

(1) で造成した各種GPCRの誘導発現プラスミドを用いて、そのGPCRの構成活性を、下記1～5のいずれかの方法を用いて測定した。

下記第8-1表および第8-2表に、構成活性型GPCRであることが判明したGPCRに関してのみ、GPCR名、該GPCR遺伝子の配列情報源（GenBankのaccession番号または国際公開番号）、PCR条件、構築したGPCR誘導発現プラスミド名、および構成活性値を記載した。構成活性値は、 17β -エストラジオールで刺激した際のレポーター活性の誘導倍率で表した。

〔方法1〕

上記で構築したGPCR誘導発現プラスミドおよびpAGal9-nd（コントロールプラスミド）を、実施例21の（1）に記載した方法に準じて、それぞれGBRC6に導入し、安定形質転換細胞を得る。該細胞を96穴プレートに分注し（約 1×10^4 個/穴）、 37°C で1日間培養した後、各穴へ 17β -エストラジオール（終濃度 10nmol/L ）を添加し、さらに1日間培養する。

培養後、セレンテラジンh（モレキュラー・プローブズ社）（終濃度 250nmol/L ）を添加してウミシイタケ・ルシフェラーゼ活性を測定する。活性測定には、Wallac 1420 ARV0sx マルチラベルカウンタ（ワラック・ベルトールド・ジャパン社製）またはVIMカメラ（ARGUS-50/2Dルミノメータ/MP：浜松ホトニクス社製）を用いる。また、 17β -エストラジオールを添加しないで同様の実験を行い、ウミシイタケ・ルシフェラーゼ活性を測定する。 17β -エストラジオールを添加した場合の活性を添加しない場合の活性で割った値を誘導倍率とする。

〔方法2〕

上記で構築したGPCR誘導発現プラスミドおよびpAGal9-nd（コントロールプラスミド）を、実施例21の（1）に記載した方法に準じて、それぞれGBCC13に導入し、安定形質転換細胞を得る。該細胞を96穴プレートに分注し（約 1×10^4 個/穴）、 37°C

℃で1日間培養した後、各穴へ17 β -エストラジオール（終濃度10nmol/L）を添加し、さらに1日間培養する。

培養後、Steady Glo Luciferase Assay System（Promega社製）を添加して、ホタル・ルシフェラーゼ活性を測定する。活性測定には、Auto Lumat LB953（ベルトールド社）またはトップカウント（Packard社）を用いる。また、17 β -エストラジオールを添加しないで同様の実験を行い、ホタル・ルシフェラーゼ活性を測定する。17 β -エストラジオールを添加した場合の活性を添加しない場合の活性で割った値を誘導倍率とする。

〔方法3〕

GBCR2を宿主として用い、形質転換株の培養時にピューロマイシンを添加しない以外は方法1と同じGPCRの構成的活性の測定法である。

〔方法4〕

GBC7を宿主として用い、形質転換株の培養時にピューロマイシンを添加しない以外は方法2と同じGPCRの構成的活性の測定法である。

〔方法5〕

上記で構築した誘導発現プラスミドまたはpAGal9-nd（コントロールプラスミド）を、実施例19の（1）で構築したレポータープラスミドpACREplucと共に、実施例21の（1）に記載した方法に準じて、KJMGER8に導入し、安定形質転換細胞を得る。

形質転換細胞を培養する培地としては、プラストサイジンS（0.2 μ g/ml）、ハイグロマイシンB（0.3mg/ml）およびジェネティシン（0.5mg/ml）を添加した1640・ITPSG培地を用いる。培養した形質転換細胞を96穴プレートに分注し（約1 \times 10⁴個/穴）、37℃で1日間培養した後、各穴へ17 β -エストラジオール（終濃度10nmol/L）を添加し、さらに1日間培養する。

培養後、ホタル・ルシフェラーゼ活性を測定する。また、17 β -エストラジオールを添加しないで同様の実験を行い、ホタル・ルシフェラーゼ活性を測定する。17 β -エストラジオールを添加した場合の活性を添加しない場合の活性で割った値を誘導倍率とする。

各方法とも、コントロールプラスミドを導入した細胞の誘導倍率は約1である。GPCR発現プラスミドを導入した細胞の誘導倍率が高いほど、該GPCRの構成的活性

は強いと判断できる。

第8-1表

GPCR (配列情報源)	アニール 温度	酵素	鋳型 (プライマー)	発現 プラスミド	構成的活性 (測定方法)
GPR3 (U18550)	60°C	KOD	Brain corpus collosulm (配列番号105,106)	pAGal9- GPR3	6.5倍 (方法5)
GPR4 (U21051)	60°C	PfuTurbo	Lung (配列番号107,108)	pAGal9- GPR4	40倍 (方法1)
GPR6 (U18549)	60°C	ExTaq	Brain (配列番号109,110)	pAGal9- GPR6	63倍 (方法1)
GPR12 (U18548)	60°C	KOD	Brain corpus collosulm (配列番号111,112)	pAGal9- GPR12	188倍 (方法3)
GPR25 (U91939)	65°C	ExTaq	human genome (配列番号113,114)	pAGal9- GPR25	4.8倍 (方法2)
GPR26 (AF208288)	55°C	PLATINUM Pfx	Brain (配列番号115,116)	pAGal9- GPR26	26倍 (方法5)
GPR30 (AF027956)	65°C	Pyrobest	human genome (配列番号117,118)	pAGal9- GPR30	27倍 (方法1)
GPR35 (NM_005301)	60°C	PfuTurbo	human genome (配列番号119,120)	pAGal9- GPR35	25倍 (方法1)
GPR52 (AF096784)	60°C	PfuTurbo	Caudate Nucleus (配列番号121,122)	pAGal9- GPR52	40倍 (方法4)
GPR61 (AF317652)	65°C	KOD	human genome (配列番号123,124)	pAGal9- GPR61	12倍 (方法1)
GPR62 (AF317653)	60°C	PLATINUM Pfx	human genome (配列番号125,126)	pAGal9- GPR62	12倍 (方法1)

第8-2表

GPCR (配列情報源)	アニル 温度	酵素	鋳型 (プライマー)	発現 プラスミド	構成的活性 (測定方法)
GPR88 (XM_010608)	62°C	PLATINUM Pfx	human genome (配列番号127,128)	pAGal9- GPR88	15倍 (方法1)
GPR92 (AJ272207)	50°C	Herculase	human genome (配列番号129,130)	pAGal9- GPR92	11倍 (方法1)
GPCR25 (U95218)	60°C	PfuTurbo	Spleen (配列番号131,132)	pAGal9- GPCR25	20倍 (方法1)
RE2 (AF091890)	60°C	PLATINUM Pfx	Brain (配列番号133,134)	pAGal9- RE2	12倍 (方法1)
hRUP4 (W000/31258)	50°C	pyrobest	kidney (配列番号135,136)	pAGal9- hRUP4	2.2倍 (方法1)
G2A (NM_013345)	65°C	pyrobest	spleen (配列番号137,138)	pAGal9- G2A	20倍 (方法1)
OGR1 (U48405)	60°C	PfuTurbo	Brain (配列番号139,140)	pAGal9- OGR1	3.6倍 (方法1)
OGR1S221N (U48405)	60°C	PfuTurbo	Brain (配列番号139,140)	pAGal9- OGR1S221N	12.7倍 (方法1)
P2Y12 (XM_010410)	50°C	PLATINUM Pfx	Lymph Node (配列番号141,142)	pAGal9- P2Y12	6.0倍 (方法1)
IGS-1 (W001/091841)	60°C	KOD	human genome (配列番号143,144)	pAGal9- IGS1	85倍 (方法1)
HG52 (AX147830)	65°C	pyrobest	human genome (配列番号145,146)	pAGal9- HG52	43倍 (方法1)
RUP12 (AX148168)	50°C	pyrobest	human genome (配列番号147,148)	pAGal9- RUP12	7倍 (方法1)

上記に示したように、GPCRの構成的活性は方法1～5のいずれかの方法で測定可能であり、ここで取得されたGPCRは構成活性型のGPCRであることが明白となった。OGR1自身も構成活性型GPCRであるが、OGR1自身の構成的活性に比較して変異体OGR1S221Nの構成的活性はさらに増加していた。OGR1の221番目のセリンは、第6膜貫通領域中の高度に保存されたプロリン残基から数えてN末側に22残基目のアミノ酸である。最近明らかになったロドプシンの結晶構造〔Science, 289, 739

(2000)) に当てはめると、この部位のアミノ酸は、GPCR全体の高次構造、活性化に重要な残基であることが予想される。OGR1以外のGPCRについても該アミノ酸残基を異なるアミノ酸に置換することによって構成活性型変異体または構成的活性が増強した変異体を作製することができると考えられる。

上記の各形質転換細胞に17 β -エストラジオールを添加する前に、任意の物質を添加しておくことにより、各GPCRの構成的活性を阻害または増加させる物質（例えば、インバースアゴニストまたはアゴニスト）を探索することができる。

[実施例23] 新規宿主・ベクター系を用いたGPCR遺伝子の発現クローニング

(1) ヒト視床下部由来cDNAライブラリーの作製

ギブコ社製のキット (SUPERSCRIP^T Choice System for cDNA Synthesis) を用いて、ヒト視床下部由来ポリ(A)+RNA(クロンテック社製)5.0 μ gから、オリゴdTをプライマーとして二本鎖cDNAを合成した。該二本鎖cDNAの両末端にリン酸化したSfiIリンカー (特開平05-336963) を付与した後、アガロースゲル電気泳動に供し、1.0kb以上のDNA断片を回収した。

実施例18の(3)で造成したpAGal9-nd (24 μ g) を、10mmol/L トリス-HCl (pH7.5)、6mmol/L MgCl₂、50mmol/L NaCl、6mmol/L 2-メルカプトエタノールからなる緩衝液 (以下、Y-50緩衝液と略記する) 590 μ lに溶解後、80単位のSfiI (宝酒造社製、以下、特に断らないかぎり制限酵素は宝酒造社製のものを用いた) を加え、37°Cで16時間消化反応を行なった。反応後、アガロースゲル電気泳動法により該反応液より約7.0kbのDNA断片を回収した。

SfiIリンカーを付与した二本鎖DNA (1.0kb以上) をT4リガーゼ緩衝液250 μ lに溶解後、該溶解液に、pAGal9-nd由来の約7.0kbのDNA断片2 μ g、およびT4DNAリガーゼ2000単位を加えて、16°Cで16時間結合反応を行なった。反応後、該反応液にトランスファーRNA (tRNA) 5 μ gを添加し、エタノール沈殿後、TE緩衝液20 μ lに溶解した。

該溶解液を用い、エレクトロポレーション法 [Nucleic Acids Res., 16, 6127 (1988)] により大腸菌MC1061(モレキュラー・クローニング第3版) を形質転換し、cDNAライブラリー (大腸菌) を構築した。該cDNAライブラリーよりアンピシリン耐性を有する形質転換体 (クローン) 約3 \times 10⁷個が得られた。

該cDNAライブラリー（大腸菌）を約100クローンずつのプールに分けて96穴プレート（細胞培養用マルチプレート96FII；住友ベークライト社製）で培養後、一部を分取し、グリセロール（最終濃度25%）を添加して-80℃で凍結保存した。

残りの培養液から、QIAprep 96 Turbo Miniprep Kit（キアゲン社製）を用いて、プラスミドを調製した。該プラスミドは、約0.1 μ g/ μ lになるようにTE緩衝液に溶解した。

(2) コルチスタチン（cortistatin）に反応する受容体をコードするcDNAの発現クローニング

実施例20で取得したGBCRC6に、リポフェクトアミン2000（ギブコ社製）を用いて、上記（1）で調製した約100クローン由来のプラスミドを各プールごとに該細胞に導入した。遺伝子導入の具体的方法はリポフェクトアミン2000の説明書に従って行い、1穴あたりプラスミドを0.3 μ g、リポフェクトアミン2000を0.8 μ l使用した。

1日培養後に、細胞を新たな96穴プレートに20分の1量ずつ分注した。ハイグロマイシンB（0.3mg/ml）、プラストサイジンS（0.2 μ g/ml）、ピューロマイシン（0.2 μ g/ml）、ジェネティシン（0.5mg/ml）を含むRPMI1640・ITPSG培地に培地を交換し、37℃で5日間培養して安定形質転換株を取得した。

各穴へ17 β -エストラジオール（終濃度10nmol/L）を添加し、さらに1日間培養した。各穴へコルチスタチン（ペプチド研究所社製）（終濃度100nmol/L）を添加し、6時間培養後、セレンテラジンh（モレキュラー・プローブズ社）（終濃度250nmol/L）を添加して、ウミシイタケ・ルシフェラーゼ活性を測定した。活性測定には、Wallac 1420 ARVOsx マルチラベルカウンタ（ワラック・ベルトールド・ジャパン社製）またはVIMカメラ（ARGUS-50 / 2Dルミノメータ/ MP：浜松ホトニクス社製）を用いた。

高い活性を示した穴に対応するプール（100クローンの大腸菌）を、1クローンずつに分けて96穴プレートで培養後、一部を分取し、グリセロール（最終濃度25%）を添加して-80℃で凍結保存した。残りの培養液から、QIAprep 96 Turbo Miniprep Kit（キアゲン社製）を用いて、プラスミドを調製した。該プラスミドは、約0.1 μ g/ μ lになるようにTE緩衝液に溶解した。

該プラスミドを用いて、上記と同様のアッセイを行うことにより、コルチスタチンへの反応性を与えるプラスミドを同定した。

pAGal9-nd中の配列に特異的なプライマー（配列番号149および150に示した配列を有する合成DNA）を用いて、該cDNAの5'側および3'側の配列を決定した。決定された配列に特異的な合成DNAを調製し、それをプライマーとして用い、さらに先の塩基配列を決定した。該操作を繰り返すことにより、該cDNAの全塩基配列を決定した。塩基配列の決定には、パーキン・エルマー社のDNAシーケンサー377と反応キット（ABI Prism™ BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit: アプライド・バイオシステムズ社）を使用した。その結果、該プラスミドが含むcDNAは5型ソマトスタチン受容体（sst5）をコードしていることが判明した。該プラスミドをpAGal9-sst5と命名した。

上記のように、本系を用いてコルチスタチン等任意の物質への反応性に影響を与える遺伝子を取得できることが明らかになった。また、pAGal9-sst5を導入したGBCRC6とコルチスタチンを用いて、コルチスタチンによるsst5の活性化を阻害する物質を探索することができる。

(3) proadrenomedullin N-20 terminal peptide (PAMP)に反応する受容体をコードするcDNAの発現クローニング

PAMPはアドレノメジュリンの前駆体蛋白質から切り出される20アミノ酸からなるペプチドで、その受容体はまだ明らかになっていない〔Frontiers in Neuroendocrinology, 19, 100 (1998)〕。そこで、PAMP受容体遺伝子の発現クローニングを試みた。

コルチスタチン（終濃度100nmol/L）の代わりに、ヒトPAMP-12 (human PAMP[9-20]; ペプチド研究所社製)（終濃度100nmol/L）を用い、上記(2)の方法に準じて、ヒトPAMP-12への反応性に影響を与える遺伝子のスクリーニングを行った。

その結果、PAMP-12への反応性を与えるプラスミドを複数取得した。これらのプラスミドが含むcDNAの塩基配列を決定した結果、いずれも1型メラノコルチン受容体 (MC1R) をコードしていることが判明した。該プラスミドの一つをpAGal9-MC1Rと命名した。塩基配列は、上記(2)に記載した方法により決定した。

実施例21の(1)に記載の方法に準じて、pAGal9-MC1RをGBCRC2に導入し、安定形質転換株を取得した。該形質転換株を17β-エストラジオール（終濃度10nmol/L）で24時間刺激後、各種濃度のヒトPAMP-12またはヒトPAMP (human PAMP[1-20]; ペプチド研究所社製) を添加し、6時間後にウミシイタケ・ルシフェラーゼ活性を測

定した。結果を第16図に示した。

MC1Rは、非常に低濃度のヒトPAMP-12またはヒトPAMPに反応することが明らかになった。したがって、PAMP-12またはPAMPは、生体内においてMC1Rのリガンドとして作用していると考えられた。

本発明に基づき、PAMP-12またはPAMPがMC1Rのリガンドとして作用することを初めて見出した。本系は、PAMP-12またはPAMPによるMC1R受容体の活性化を阻害する物質（例えばアンタゴニスト）の探索にも有用である。

(4) 構成活性型GPCR (2型代謝性グルタミン酸受容体:mGlu2)、シグナル伝達分子($G\alpha_{si}$)、または転写因子(DP2とID4)をコードするcDNAの発現クローニング

GBCRC6をRPMI1640・ITPSG培地に懸濁後、96穴プレートに分注し(約 1×10^4 個/穴)、37°Cで1日間培養した。培養後、上記(2)に記載の方法に準じて、上記(1)で調製した各プール(約100クローン)由来のプラスミドを各プールごとに該細胞に導入し、安定形質転換株を取得した。

各穴へ17 β -エストラジオール(終濃度10nmol/L)を添加し、さらに1日間培養後、セレンテラジンh(終濃度250nmol/L)を添加してウミシイタケ・ルシフェラーゼ活性を測定した。活性測定は上記(2)に記載の方法に準じて行った。

高い活性を示した穴に対応するプール(100クローンの大腸菌)を、1クローンずつに分けて96穴プレート(細胞培養用マルチプレート96FII、住友ベークライト社)で培養後、一部を分取し、グリセロール(最終濃度25%)を添加して-80°Cで凍結保存した。残りの培養液から、QIAprep 96 Turbo Miniprep Kit(キアゲン社製)を用いて、プラスミドを調製した。該プラスミドは、約 $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ になるようにTE緩衝液に溶解した。

該プラスミドを用いて、上記と同様のアッセイを行うことにより、高い活性を与えるプラスミド4種を取得した。これらプラスミドが含むcDNAの塩基配列を上記(2)に記載した方法に準じて決定した結果、これらプラスミドはそれぞれ2型の代謝性グルタミン酸受容体(mGlu2)、シグナル伝達分子 $G\alpha_{si}$ 、転写因子DP2、および転写因子ID4をコードする遺伝子を含有していた。該プラスミドをそれぞれpAGal9-mGlu2、pAGal9- $G\alpha_{si}$ 、pAGal9-dP2、およびpAGal9-ID4と命名した。

本系を用いて、構成活性型GPCR(例えばmGlu2)、シグナル伝達分子(例えば $G\alpha_{si}$)および転写因子(例えばDP2とID4)を取得できることが実証された。この結

果は、本系を用いて、構成活性型GPCRの他に、CREが関与する遺伝子の転写を直接あるいは間接的に制御しうる分子を取得可能であることを示している。

目的に応じて他のレポーター系を使用すれば、該レポーターの活性を制御しうる様々な分子の遺伝子が取得可能なことが分かる。例えば、NF κ Bの活性化を検出するためのレポーター系を用いることにより、NF κ Bの活性化に関与する様々な分子（例えば、受容体、分泌蛋白質、シグナル伝達分子、転写因子など）の遺伝子を本方法により取得することが可能である。

実施例22に記載の方法に準じて、上記で取得したペプチド（構成的活性を示す受容体、転写因子、シグナル伝達分子、酵素等）の活性を阻害または活性化する物質を探索することができる。即ち、GBCRC6あるいはGBCC13にpAGal9-mGlu2を導入した形質転換細胞に、任意の物質を添加し、その後に17 β -エストラジオールを添加することにより、mGlu2の構成的活性を阻害または増加させる物質（例えば、インバースアゴニストまたはアゴニスト）を探索することができる。

GBCRC6あるいはGBCC13にpAGal9-G α_{s1} を導入した形質転換細胞に、任意の物質を添加し、その後に17 β -エストラジオールを添加することにより、G α_{s1} の関与するシグナル伝達を阻害または増加させる物質を探索することができる。

GBCRC6あるいはGBCC13にpAGal9-dP2を導入した形質転換細胞に、任意の物質を添加し、その後に17 β -エストラジオールを添加することにより、DP2を介したCREからの転写を阻害または増加させる物質を探索することができる。

さらに、GBCRC6あるいはGBCC13にpAGal9-ID4を導入した形質転換細胞に、任意の物質を添加し、その後に17 β -エストラジオールを添加することにより、ID4を介したCREからの転写を阻害または増加させる物質を探索することができる。

このように、EBNA-1遺伝子を発現する無血清馴化したB細胞株を用いたレポーター系は、汎用性および感度が非常に高い系であり、発現クローニングや物質のスクリーニング等に、非常に有用な系である。

[実施例24] 新規宿主・ベクター系を用いた構成活性型の変異GPCRの造成

実施例23に記載した発現クローニングにおいて、cDNAライブラリーの代わりに、変異GPCRのライブラリーを使用することにより、構成活性型の変異GPCRを効率よく造成することができる。また、特定の変異GPCRについて、実施例22に記載の方

法に準じて一つずつ評価することにより、構成活性型の変異GPCRを造成することもできる。

(1) PGM0334の誘導発現プラスミドpAGal9-PGM0334の造成

構成活性型でないGPCRであるPGM0334の発現プラスミドpAMo-PGM0334（特開2001-211885）をHindIIIおよびNotIで切断後、PGM0334 cDNAを含むHindIII-NotI断片を取得した。pAGal9-ndをHindIIIおよびNotIで切断後、約1.4kbのHindIII-NotI断片を取得した。pAMo-PGM0334由来のHindIII-NotI断片、およびpAGal9-nd由来のHindIII-NotI断片を結合することにより、PGM0334の誘導発現プラスミドpAGal9-PGM0334を造成した。

(2) 変異GPCRライブラリーの造成

PGM0334ポリペプチドの第3膜貫通領域の後半から第2細胞内領域の前半部分、あるいは第3細胞内領域の後半から第6膜貫通領域の前半部分に、ランダム変異を導入した多数の変異体を、PCRを利用して以下のように造成した。

PGM0334ポリペプチドの第3膜貫通領域の後半から第2細胞内領域の前半部分（PGM0334ポリペプチドの132番目のアミノ酸から141番目のアミノ酸）にランダムに変異を導入するために、配列番号151～160に記載の塩基配列を有する合成DNAを作製した。

PGM0334ポリペプチドの第3細胞内領域の後半から第6膜貫通領域の前半部分（PGM0334ポリペプチドの256番目のアミノ酸から265番目のアミノ酸）にランダムに変異を導入するために、配列番号161～170に記載の塩基配列を有する合成DNAを作製した。

pAGal9-PGM0334中のPGM0334 cDNAの5'側および3'側のベクター部分に対応するプライマーとして、配列番号171および172に記載の塩基配列を有する合成DNAを作製した。

pAGal9-PGM0334（1ng）、配列番号151～160に記載の塩基配列を有する合成DNAのいずれか一つ（20pmol）、配列番号172に記載の塩基配列を有する合成DNA（20pmol）、2.5mmol/lのdNTP混合液を1.6μl、DMSOを1μl、5単位/μlのPyrobest DNA Polymerase（宝酒造社製）を0.1μl、10×反応緩衝液を2μl添加し、滅菌水を加えて全量を20μlに調製した。該調製液を用い下記条件でPCRを行った。即ち、サーマルサイクラーDNA Engine（MJ Research社製）を用い、95℃で5分間処理後、

94°Cで1分間、50°Cで30秒間、72°Cで1分間からなる反応を25サイクル行った。

該反応液より、アガロースゲル電気泳動法により増幅DNA断片（変異DNA1）を回収した。該DNA断片はそれぞれPGM0334ポリペプチドの132～141番目のアミノ酸のいずれか1つにランダム変異が導入されたポリペプチド（C末端側のポリペプチド）をコードするDNAである。

同様に、pAGa19-PGM0334を鋳型、配列番号161～170に記載の塩基配列を有する合成DNAのいずれか一つ、および配列番号171に記載の塩基配列を有する合成DNAをプライマーとしてPCRを行うことにより、PGM0334ポリペプチドの256番目のアミノ酸から265番目のアミノ酸のいずれか1つにランダム変異が導入されたポリペプチド（N末端側のポリペプチド）をコードするDNA（変異DNA2）を取得した。

取得した変異DNA1の25分の1量および変異DNA2の25分の1量、2.5mmol/lのdNTP混合液を1.6 μ l、DMSOを1 μ l、5単位/ μ lのPyrobest DNA Polymerase（宝酒造社製）を0.1 μ l、10 \times 反応緩衝液を2 μ l添加し、滅菌水を加えて全量を20 μ lに調製した。該調製液を用い、下記条件でPCRを行った。即ち、サーマルサイクラーDNA Engine（MJ Research社製）を用い、98°Cで5分間処理後、98°Cで15秒間、50°Cで20秒間、72°Cで30秒間からなる反応を6サイクル行った。

該反応液に、配列番号171に記載の塩基配列を有する合成DNA（20pmol）、および配列番号172に記載の塩基配列を有する合成DNA（20pmol）を加えた後、サーマルサイクラーDNA Engine（MJ Research社製）を用い、95°Cで2分間処理後、95°Cで15秒間、60°Cで20秒間、72°Cで1分間からなる反応を23サイクル行った。

該反応液より、アガロースゲル電気泳動法により増幅DNA断片（変異DNA3）を回収した。変異DNA3をHindIIIおよびNotIで切断後、プラスミドpAGa19-ndのHindIII-NotI間へ組み込込むことにより、PGM0334の変異体を誘導発現することのできるPGM0334変異体ライブラリーを造成した。ライブラリーの造成は、実施例22の（1）に記載した方法に準じて行った。即ち、大腸菌MC1061（モレキュラー・クローニング第3版）を宿主として、約 1×10^4 個のアンピシリン耐性を有する形質転換体を取得し、PGM0334変異体ライブラリー（大腸菌）を構築した。

該PGM0334変異体ライブラリー（大腸菌）を10クローンずつのプールに分けて96穴プレート（細胞培養用マルチプレート96FII；住友ベークライト社製）で培養後、一部を分取し、グリセロール（最終濃度25%）を添加して-80°Cで凍結保存した。

残りの培養液から、QIAprep 96 Turbo Miniprep Kit (Qiagen社製) を用いて、プラスミドを調製した。該プラスミドは、約 $0.1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ になるようにTE緩衝液に溶解した。

(3) 構成活性型の変異GPCRの取得

実施例23の(2)に記載の方法にしたがって、上記(2)で調製した変異GPCRライブラリーの10クローン由来のプラスミドをそれぞれGBCRC6に導入し、安定形質転換株を取得した。各穴へ 17β -エストラジオール(終濃度 10nmol/L)を添加し、さらに1日間培養後、セレンテラジンh(終濃度 250nmol/L)を添加してウミシイタケ・ルシフェラーゼ活性を測定した。活性測定は実施例23の(2)に記載の方法を用いた。

高い活性を示した穴に対応するプール(10クローンの大腸菌)を、1クローンずつに分けて96穴プレート(細胞培養用マルチプレート96FII、住友ベークライト社)で培養後、一部を分取し、グリセロール(最終濃度25%)を添加して -80°C で凍結保存した。残りの培養液から、QIAprep 96 Turbo Miniprep Kit (キアゲン社製)を用いて、プラスミドを調製した。該プラスミドは、約 $0.1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ になるようにTE緩衝液に溶解した。

該プラスミドを用いて、上記と同様のアッセイを行うことにより、高い活性を与えるプラスミドを同定した。同定後、該プラスミドが含むcDNAの塩基配列を実施例23の(2)に記載した方法に準じて決定した。

上記のスクリーニングの結果、以下の4種の構成活性型の変異体を取得した。

(i) PGM0334ポリペプチドの135番目のグルタミン酸をフェニルアラニンに置換した変異体(PGM0334E135Fと呼ぶ): 実施例22の(2)に記載の方法(GBCRC6を宿主として利用)で評価した結果、約3倍の誘導倍率を示し、構成活性型GPCRであることが確認された。アミノ酸配列を配列番号193に示した。

(ii) PGM0334ポリペプチドの135番目のグルタミン酸をグルタミンに置換した変異体(PGM0334E135Qと呼ぶ): 同様に評価した結果、約3倍の誘導倍率を示し、構成活性型GPCRであることが確認された。アミノ酸配列を配列番号194に示した。

(iii) PGM0334ポリペプチドの135番目のグルタミン酸をアラニンに置換した変異体(PGM0334E135Aと呼ぶ): 同様に評価した結果、約14倍の誘導倍率を示し、構成活性型GPCRであることが確認された。アミノ酸配列を配列番号195に示した。

(iv) PGM0334ポリペプチドの259番目のアスパラギン酸をセリンに置換した変異体 (PGM0334D259Sと呼ぶ) : 同様に評価した結果、約5倍の誘導倍率を示し、構成活性型GPCRであることが確認された。アミノ酸配列を配列番号196に示した。PGM0334の259番目のアスパラギン酸は、第6膜貫通領域中の高度に保存されたプロリン残基から数えてN末側に20残基目のアミノ酸であり、多くのGPCRにおいてグルタミン酸もしくはアスパラギン酸が保存されている。最近明らかになったロドプシンの結晶構造 [Science, 289, 739 (2000)] に当てはめると、この部位のアミノ酸は、下記 (4) に述べるD/ERYモチーフ内のアスパラギン酸もしくはグルタミン酸残基と立体構造上側鎖が向かい合うことになり、GPCR全体の高次構造、活性化に重要な残基であることが予想される。PGM0334以外のGPCRに関しても該アミノ酸残基を異なるアミノ酸に置換することによって構成活性型変異体を作製することができると考えられる。

また、使用した転写因子応答配列 (例えば、CREやNF κ B応答配列) からの転写を直接または間接的に増加させる活性を有する分子 (例えば、転写因子、シグナル伝達分子、または酵素等) に関しても、上記と同様にしてランダム変異を導入することにより、構成活性型の変異体を取得することができる。

また、上記分子にランダム変異を入れることによって、構成的活性を示さなくなった変異体やドミナントネガティブ変異体を取得することもできる。

(4) 他の構成活性型変異体の造成

GPCRの第3膜貫通領域細胞内側には高度に保存されたD/ERYモチーフが存在する。該モチーフ内のアスパラギン酸もしくはグルタミン酸残基は、他の膜貫通領域との相互作用に重要な働きをになっていることが示唆されている [Science, 289, 739 (2000); EMBO J., 12, 1693 (1993)]。また、あるGPCR (たとえばV2バソプレッシン受容体) においては該アスパラギン酸もしくはグルタミン酸残基を別のアミノ酸に置換することにより構成活性型変異体を作製できることが知られている [FEBS letter, 441, 470 (1998)]。そこで、多種のオーファンGPCRに関して、以下のようにして該アスパラギン酸もしくはグルタミン酸残基をアラニンに変換した変異体をコードするDNAの造成を行い、該変異体の構成的活性を評価した。

GPCR遺伝子への目的とする変異導入は、変異導入キットQuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (ストラタジーン社製) を用い、該キットのプロトコ

ールに準じて以下のようにして行った。

第9表に示したオーファンGPCRの変異体の造成においては、目的の変異を含み変異導入部位周辺と同じ配列を持つ、第9表に示した、35塩基程度の相補的な2本のプライマーを合成した。該プライマーを用いてGPCR発現プラスミドを鋳型とし、PCRを行った。該反応液にDpnI（メチル化DNAを選択的に切断する制限酵素）を添加し、鋳型プラスミドを選択的に切断した。このようにして得られたDNA断片は、目的の変異が導入された遺伝子とベクター部分を含んでいる。取得された該DNA断片を大腸菌にトランスフォームすることにより、目的の変異が導入された遺伝子を含むプラスミドが得られた。

取得されたプラスミドに含まれる遺伝子がコードする変異体GPCRの構成的活性は、実施例22の（2）に記載の方法1を用いて測定した。

その結果、構成的活性が増強したことが判明したオーファンGPCRの変異体を第9表に示した。

第9表

GPCR変異体 (由来GPCR)	変異 位置	変異	鋳型プラスミド (プライマー配列番号)	発現 プラスミド	構成的 活性
OGR1S221N/D118A (OGR1S221N)	118	Asp→Ala	pAga19- OGR1S221N	pAga19- OGR1S221N/D118A	56倍
RE2D124A (RE2)	124	Asp→Ala	pAga19-RE2 (175、176)	pAga19- RE2D124A	32倍
GPR35D113A (GPR35)	113	Asp→Ala	pAga19-GPR35 (177、178)	pAga19- GPR35D113A	97倍
GPCR25D111A (GPCR25)	111	Asp→Ala	pAga19-GPCR25 (179、180)	pAga19- GPCR25D111A	35倍

変異位置：ポリペプチドのN末端からの位置を表す。

Asp→Ala：アスパラギン酸がアラニンに置換されたことを表す。

表8-1表または第8-2表に示したように、OGR1S221N、RE2、GPR35およびGPCR25はもともと構成活性型GPCRであるが、上記の変異を導入することにより、構成的活性がさらに上昇することが明らかになった。一方、必ずしもこの変異により構成活性型変異体が造成できる訳ではないことも明らかになった。OGR1S221N/D118A、RE2D124A、GPR35D113AおよびGPCR25D111Aのアミノ酸配列をそれぞれ配列番号189、190、191および192にそれぞれ示した。また、OGR1S221N/D118Aと同様に、OGR1の

118番目のアスパラギン酸をアラニンに置換した変異体OGR1D118A（アミノ酸配列を配列番号188に示した）も同様に構成活性を示すと考えられる。

〔実施例25〕新規宿主・ベクター系を用いたオーファンGPCRのリガンドまたはアゴニストの探索

(1) GPR43の誘導発現プラスミドpAGal9-GPR43の造成

実施例20の(1)に記載した方法に準じて、PCRによりGPR43遺伝子を取得し、該遺伝子を発現ベクターpAGal9-dに組み込むことにより、GPR43の誘導発現プラスミドpAGal9-GPR43を造成した。鋳型としては、ヒト染色体DNA（100ng；クロンテック社製）を用いた。GPR43遺伝子特異的プライマーとしては、配列番号181および182に記載した配列を有する合成DNAを使用した。上記プライマーには、それぞれHindIIIサイトおよびNotIサイトが導入されている。

PCR増幅断片をHindIIIおよびNotIで切断後、HindIII-NotI断片を取得した。プラスミドpAGal9-dをHindIIIおよびNotIで切断後、HindIII-NotI断片を取得した。PCR断片由来のHindIII-NotI断片、およびpAGal9-d由来のHindIII-NotI断片を結合することにより、GPR43の誘導発現プラスミドpAGal9-GPR43を造成した。

(2) GPR43のリガンドまたはアゴニストの探索

実施例21の(1)に記載した方法に準じて、pAGal9-GPR43をGBCRC6に導入し、安定形質転換株を取得した。該形質転換株を17β-エストラジオール（終濃度10nmol/L）で24時間刺激後、100nmol/Lから100μmol/Lの各種物質を添加し、6時間後にウミシイタケ・ルシフェラーゼ活性を測定した。

その結果、100μmol/Lの酢酸（CH₃COOH）、プロピオン酸（CH₃CH₂COOH）、および酢酸塩（CH₃COONa）が、GPR43のアゴニストとして作用することが判明した（レポーターの誘導倍率はそれぞれ4倍、5倍、9倍）。したがって、酢酸、プロピオン酸、酢酸塩、またはプロピオン酸塩をアゴニストとして用いて、GPR43のアンタゴニストの探索を行うことができる。酢酸および酢酸塩は、他のGPCRを導入したアッセイ細胞には作用しなかったことから、GPR43特異的なアゴニスト活性を有することが判明した。下記(4)に示すように、プロピオン酸はGPR41に対してもアゴニスト活性を示した

(3) GPR41の誘導発現プラスミドpAGal9-GPR41の造成

実施例20の(1)に記載した方法に準じて、PCRによりGPR41遺伝子を取得し、該遺伝子を発現ベクターpAGal9-dに組み込むことにより、GPR41の誘導発現プラスミドpAGal9-GPR41を造成した。鋳型としては、ヒト染色体DNA(100ng; クロンテック社製)を用いた。GPR41遺伝子特異的プライマーとしては、配列番号183および184に記載した配列を有する合成DNAを使用した。上記プライマーには、それぞれHindIIIサイトおよびNotIサイトが導入されている。

PCR増幅断片をHindIIIおよびNotIで切断後、HindIII-NotI断片を取得した。プラスミドpAGal9-dをHindIIIおよびNotIで切断後、HindIII-NotI断片を取得した。PCR断片由来のHindIII-NotI断片、およびpAGal9-d由来のHindIII-NotI断片を結合することにより、GPR41の誘導発現プラスミドpAGal9-GPR41を造成した。

(4) GPR41のリガンドまたはアゴニストの探索

実施例21の(1)に記載した方法に準じて、pAGal9-GPR41をGBCRC6に導入し、安定形質転換株を取得した。該形質転換株を17 β -エストラジオール(終濃度10nmol/L)で24時間刺激後、100nmol/Lから1000nmol/Lの各種物質を添加し、6時間後にウミシイタケ・ルシフェラーゼ活性を測定した。

その結果、100 μ mol/Lのプロピオン酸($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$)およびシクロプロパンカルボン酸が、GPR41のアゴニストとして作用することが判明した(レポーターの誘導倍率はそれぞれ21倍と22倍)。したがって、プロピオン酸またはシクロプロパンカルボン酸をアゴニストとして用いて、GPR41のアンタゴニストの探索を行うことができる。シクロプロパンカルボン酸は他のGPCRを導入したアッセイ細胞には作用しなかったことから、GPR41特異的なアゴニスト活性を有することが判明した。GPR43に対してアゴニスト活性を示した酢酸や酢酸塩はGPR41に対してはアゴニスト活性を示さなかった。

(5) G10dの誘導発現プラスミドpAGal9-G10dの造成

実施例20の(1)に記載した方法に準じて、PCRによりG10d遺伝子を取得し、該遺伝子を発現ベクターpAGal9-dに組み込むことにより、G10dの誘導発現プラスミドpAGal9-G10dを造成した。鋳型としては、ヒト脾臓由来一本鎖DNAを用いた。G10d遺伝子特異的プライマーとしては、配列番号185および186に記載した配列を有する合成DNAを使用した。上記プライマーには、それぞれHindIIIサイトおよびNotIサイトが導入されている。

PCR増幅断片をHindIIIおよびNotIで切断後、HindIII-NotI断片を取得した。プラスミドpGal9-dをHindIIIおよびNotIで切断後、HindIII-NotI断片を取得した。PCR断片由来のHindIII-NotI断片、およびpGal9-d由来のHindIII-NotI断片を結合することにより、G10dの誘導発現プラスミドpGal9-G10dを造成した。

(6) G10dのリガンドまたはアゴニストの探索

実施例21の(1)に記載した方法に準じて、pGal9-G10dをGBCRC6に導入し、安定形質転換株を取得した。該形質転換株を17 β -エストラジオール（終濃度10nmol/L）で24時間刺激後、100nmol/Lまたは1000nmol/Lの各種物質を添加し、6時間後にウミシイタケ・ルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、100nmol/Lの α -メラノサイト刺激ホルモン（ α -MSH）および100nmol/Lの副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）がG10dのアゴニストとして作用することが判明した（レポーターの誘導倍率はそれぞれ10倍と11倍）。 α -MSHまたはACTHはコントロールベクター（pGal9-d）を導入したGBCRC6には作用しなかった。 α -MSHまたはACTHをアゴニストとして用いて、G10dのアンタゴニストの探索を行うことができる。

【実施例26】 GPR43の構成活性型変異体の造成

実施例24に記載した方法と同様にして、GPR43の構成活性型変異体を造成した。

(1) GPR43変異体ライブラリーの造成

実施例24(2)に記載した方法と同様にして、GPR43ポリペプチドの第3膜貫通領域の後半から第2細胞内領域の前半部分（GPR43ポリペプチドの103番目のアミノ酸から112番目のアミノ酸）、あるいは第3細胞内領域の後半から第6膜貫通領域の前半部分（GPR43ポリペプチドの213番目のアミノ酸から222番目のアミノ酸）に、ランダム変異を導入したGPR43変異体ライブラリーを、造成した。ランダム変異を導入するためのPCRの鋳型としては、実施例25の(1)で造成した、GPR43の誘導発現プラスミドpGal9-GPR43を用いた。

(2) 構成活性型のGPR43変異体の取得

実施例24(3)に記載した方法と同様にして、上記(1)で造成したGPR43変異体ライブラリーを用いて、構成活性型のGPR43変異体を選択した。その結果、GPR43ポリペプチドの217番目のアルギニンをプロリンに置換した変異体（GPR43R217Pと呼ぶ）は、実施例22の(2)に記載の方法（GBCRC6を宿主として利用）で評価した

結果、約2倍の誘導倍率を示し、構成活性型GPCRであることが確認された。GPR43R217Pのアミノ酸配列を配列番号197に示した。

(3) GPR43R217Pポリペプチドにさらに変異を導入した変異体の造成

実施例24 (2) に記載したランダム変異の導入方法と同様にして、GPR43R217PポリペプチドのD/ERYモチーフ中にある106番目のグルタミン酸残基を他のアミノ酸に置換した変異体をコードするDNAを造成した。変異導入用の鋳型としては、上記(2) で取得した、GPR43R217Pの誘導発現プラスミドpAGal9-GPR43R217Pを用いた。

上記で造成したDNAがコードする変異体の構成活性を、実施例22の(2) に記載の方法 (GBCRC6を宿主として利用) で評価することにより、構成活性がさらに上昇した変異体を選択した。その結果、GPR43R217Pポリペプチドの106番目のグルタミン酸をアスパラギン酸に置換した変異体 (GPR43R217PE106Dと呼ぶ) は、約17倍の誘導倍率を示し、GPR43R217Pポリペプチドに比較してさらに構成活性が増加していることが明らかになった。GPR43R217PE106Dのアミノ酸配列を配列番号198に示した。

GPR43R217PE106DをコードするDNAは、GPR43の誘導発現プラスミドpAGal9-GPR43を鋳型として、変異導入キットQuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (ストラタジーン社製) を用いて造成することもできる。

産業上の利用の可能性

本発明により、哺乳動物の内分泌細胞由来の多様な細胞株、該細胞株を宿主として用いた、活性ペプチド前駆体遺伝子の発現クローニング系および活性ペプチドの生産法、該細胞株を用いた、該細胞に作用する物質の探索法や評価法、該細胞株を用いた有用遺伝子、有用ペプチドの探索法および取得法、上記の発現クローニング系で使用する高感度で簡便なGPCRリガンドのアッセイ系が提供される。

配列表フリーテキスト

配列番号1-発明者：佐々木克敏；三浦和美；佐伯智

発明者：吉澤美佐子；岸本和也

発明者：國友博文；西達也；帯刀益夫

配列番号1-合成DNA

配列番号2-合成DNA
配列番号3-合成DNA
配列番号4-合成DNA
配列番号5-合成DNA
配列番号6-合成DNA
配列番号7-合成DNA
配列番号8-合成DNA
配列番号9-合成DNA
配列番号10-合成DNA
配列番号11-合成DNA
配列番号12-合成DNA
配列番号13-合成DNA
配列番号14-合成DNA
配列番号15-合成DNA
配列番号16-合成DNA
配列番号17-合成DNA
配列番号18-合成DNA
配列番号19-合成DNA
配列番号20-合成DNA
配列番号21-合成DNA
配列番号22-合成DNA
配列番号23-合成DNA
配列番号24-合成DNA
配列番号25-合成DNA
配列番号26-合成DNA
配列番号28-合成DNA
配列番号29-合成DNA
配列番号30-合成DNA
配列番号31-合成DNA
配列番号32-合成DNA

配列番号33-合成DNA
配列番号34-合成DNA
配列番号35-合成DNA
配列番号36-合成DNA
配列番号37-合成DNA
配列番号38-合成DNA
配列番号39-合成DNA
配列番号40-合成DNA
配列番号41-合成DNA
配列番号42-合成DNA
配列番号43-合成DNA
配列番号44-合成DNA
配列番号45-合成DNA
配列番号46-合成DNA
配列番号47-合成DNA
配列番号48-合成DNA
配列番号49-合成DNA
配列番号50-合成DNA
配列番号51-合成DNA
配列番号52-合成DNA
配列番号53-合成DNA
配列番号54-合成DNA
配列番号55-合成DNA
配列番号56-合成DNA
配列番号57-合成DNA
配列番号58-合成DNA
配列番号59-合成DNA
配列番号60-合成DNA
配列番号61-合成DNA
配列番号62-合成DNA

配列番号63-合成DNA
配列番号64-合成DNA
配列番号65-合成DNA
配列番号66-合成DNA
配列番号67-合成DNA
配列番号68-合成DNA
配列番号69-合成DNA
配列番号70-合成DNA
配列番号71-合成DNA
配列番号72-合成DNA
配列番号73-合成DNA
配列番号74-合成DNA
配列番号75-合成DNA
配列番号76-合成DNA
配列番号77-合成DNA
配列番号78-合成DNA
配列番号79-合成DNA
配列番号80-合成DNA
配列番号81-合成DNA
配列番号82-合成DNA
配列番号83-合成DNA
配列番号84-合成DNA
配列番号85-合成DNA
配列番号86-合成DNA
配列番号87-合成DNA
配列番号88-合成DNA
配列番号89-合成DNA
配列番号90-合成DNA
配列番号91-合成DNA
配列番号92-合成DNA

配列番号93-合成DNA
配列番号94-合成DNA
配列番号95-合成DNA
配列番号96-合成DNA
配列番号97-合成DNA
配列番号98-合成DNA
配列番号99-合成DNA
配列番号100-合成DNA
配列番号101-合成DNA
配列番号102-合成DNA
配列番号103-合成DNA
配列番号104-合成DNA
配列番号105-合成DNA
配列番号106-合成DNA
配列番号107-合成DNA
配列番号108-合成DNA
配列番号109-合成DNA
配列番号110-合成DNA
配列番号111-合成DNA
配列番号112-合成DNA
配列番号113-合成DNA
配列番号114-合成DNA
配列番号115-合成DNA
配列番号116-合成DNA
配列番号117-合成DNA
配列番号118-合成DNA
配列番号119-合成DNA
配列番号120-合成DNA
配列番号121-合成DNA
配列番号122-合成DNA

配列番号123-合成DNA
配列番号124-合成DNA
配列番号125-合成DNA
配列番号126-合成DNA
配列番号127-合成DNA
配列番号128-合成DNA
配列番号129-合成DNA
配列番号130-合成DNA
配列番号131-合成DNA
配列番号132-合成DNA
配列番号133-合成DNA
配列番号134-合成DNA
配列番号135-合成DNA
配列番号136-合成DNA
配列番号137-合成DNA
配列番号138-合成DNA
配列番号139-合成DNA
配列番号140-合成DNA
配列番号141-合成DNA
配列番号142-合成DNA
配列番号133-合成DNA
配列番号144-合成DNA
配列番号145-合成DNA
配列番号146-合成DNA
配列番号147-合成DNA
配列番号148-合成DNA
配列番号149-合成DNA
配列番号150-合成DNA
配列番号151-合成DNA
配列番号151-nはa、g、cまたはt

配列番号152-合成DNA

配列番号152-nはa、g、cまたはt

配列番号153-合成DNA

配列番号153-nはa、g、cまたはt

配列番号154-合成DNA

配列番号154-nはa、g、cまたはt

配列番号155-合成DNA

配列番号155-nはa、g、cまたはt

配列番号156-合成DNA

配列番号156-nはa、g、cまたはt

配列番号157-合成DNA

配列番号157-nはa、g、cまたはt

配列番号158-合成DNA

配列番号158-nはa、g、cまたはt

配列番号159-合成DNA

配列番号159-nはa、g、cまたはt

配列番号160-合成DNA

配列番号160-nはa、g、cまたはt

配列番号161-合成DNA

配列番号161-nはa、g、cまたはt

配列番号162-合成DNA

配列番号162-nはa、g、cまたはt

配列番号163-合成DNA

配列番号163-nはa、g、cまたはt

配列番号164-合成DNA

配列番号164-nはa、g、cまたはt

配列番号165-合成DNA

配列番号165-nはa、g、cまたはt

配列番号166-合成DNA

配列番号166-nはa、g、cまたはt

配列番号167-合成DNA

配列番号167-nはa、g、cまたはt

配列番号168-合成DNA

配列番号168-nはa、g、cまたはt

配列番号169-合成DNA

配列番号169-nはa、g、cまたはt

配列番号170-合成DNA

配列番号170-nはa、g、cまたはt

配列番号171-合成DNA

配列番号172-合成DNA

配列番号173-合成DNA

配列番号174-合成DNA

配列番号175-合成DNA

配列番号176-合成DNA

配列番号177-合成DNA

配列番号178-合成DNA

配列番号179-合成DNA

配列番号180-合成DNA

配列番号181-合成DNA

配列番号182-合成DNA

配列番号183-合成DNA

配列番号184-合成DNA

配列番号185-合成DNA

配列番号186-合成DNA

配列番号187-OGR1S221N

配列番号188-OGR1D118A

配列番号189-OGR1S221N/D118A

配列番号190-RE2D124A

配列番号191-GPR35D113A

配列番号192-GPCR25D111A

配列番号193-PGM0334E135F

配列番号194-PGM0334E135Q

配列番号195-PGM0334E135A

配列番号196-PGM0334D259S

配列番号197-GPR43R217P

配列番号198-GPR43R217PE106D

請求の範囲

1. 下記 (1) ~ (5) の工程を有する、目的とする受容体のアゴニスト、アンタゴニストまたはインバースアゴニストとして作用するペプチドをコードするDNAの取得方法。

(1) 任意のcDNAまたは染色体由来のDNAを内分泌細胞由来の細胞株に導入して形質転換株を取得する

(2) 上記 (1) の形質転換株を培養し、導入したDNAを発現させた後、該形質転換株の培養上清、細胞抽出液、膜画分、または該形質転換株自身を、目的とする受容体を発現する細胞と接触させる

(3) 該受容体に基づく細胞の応答反応を検出する

(4) 該形質転換株の培養上清、細胞抽出液、膜画分、または該形質転換株自身が目的の活性を示した形質転換株を選択する

(5) 上記 (4) の形質転換株に導入したDNAを、形質転換株に目的の活性を与えるDNAとして同定する

2. 下記 (1) ~ (7) の工程を有する、目的とする受容体のアゴニスト、アンタゴニストまたはインバースアゴニストとして作用するペプチドをコードするDNAの取得方法。

(1) 発現ベクターを用いて作製したcDNAライブラリーを1~10000のクローンずつのプールに分ける

(2) 各プールに由来するcDNAクローンの混合物を内分泌細胞由来の細胞株に導入して形質転換株を取得する

(3) 上記 (2) の形質転換株を各プールごとに培養して、導入したcDNAを発現させた後、該形質転換株の培養上清、細胞抽出液、膜画分、または該形質転換株自身を、プールごとに目的とする受容体を発現する細胞と接触させる

(4) 該受容体に基づく細胞の応答反応をプールごとに検出する

(5) 該形質転換株の培養上清、細胞抽出液、膜画分、または該形質転換株自身が目的の活性を示したプールを選択し、選択したプールを (1) よりも細かいプールに分ける

(6) (2) ~ (5) の操作をプールが1クローンごとになるまで繰り返す

- (7) 形質転換株に目的の活性を与えるcDNAを同定する
3. 任意のcDNAまたは染色体由来の遺伝子が、活性ペプチド前駆体をコードする遺伝子である、請求項1または2に記載のDNAの取得方法。
4. 受容体がG蛋白質共役型受容体である、請求項1または2に記載のDNAの取得方法。
5. G蛋白質共役型受容体がオーファンG蛋白質共役型受容体である、請求項4に記載のDNAの取得方法。
6. 内分泌細胞由来の細胞株が、SV40のラージT抗原遺伝子を発現する内分泌細胞由来の細胞株である、請求項1または2に記載のDNAの取得方法。
7. 内分泌細胞由来の細胞株が、SV40の温度感受性変異株のラージT抗原遺伝子を発現する内分泌細胞由来の細胞株である、請求項1または2に記載のDNAの取得方法。
8. 内分泌細胞由来の細胞株が、非ヒト・トランスジェニック動物細胞由来の細胞株である、請求項1、2、6または7に記載のDNAの取得方法。
9. 非ヒト・トランスジェニック動物がトランスジェニックラットである請求項8に記載のDNAの取得方法。
10. SV40の温度感受性変異株がSV40tsA58である請求項7に記載のDNAの取得方法。
11. 内分泌細胞由来の細胞株が、視床下部またはランゲルハンス氏島由来の細胞株である、請求項1、2、6、7または8に記載のDNAの取得方法。
12. 内分泌細胞由来の細胞株が、レプチン受容体 (Ob-Rb) 遺伝子、プレプロニューロメディンU遺伝子、RFamide-related peptide (RFRP) プレプロ蛋白質遺伝子、プレプロオレキシン遺伝子、プレプロオビオメラノコルチン遺伝子、プレプロニューロペプチドY遺伝子、プレプロニューロペプチドFF遺伝子、プレプロコルチコトロピン放出ホルモン遺伝子、プレプロサイロトロピン放出ホルモン遺伝子、プレプログレリン遺伝子、プレプロメラニン凝集ホルモン遺伝子、cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) 遺伝子、2型ニューロメディンU受容体 (NMU2R) 遺伝子、RFRP受容体遺伝子、4型メラノコルチン受容体 (MC4R) 遺伝子、1型ニューロペプチドY受容体 (NPY1R) 遺伝子、5型ニューロペプチドY受容体 (NPY5R) 遺伝子、2型ニューロペプチドFF受容体 (NPFF2) 遺

伝子、1型コルチコトロピン放出ホルモン受容体 (CRHR-1) 遺伝子、2型コルチコトロピン放出ホルモン受容体 (CRHR-2) 遺伝子、グレリン受容体遺伝子、1型メラニン凝集ホルモン受容体 (MCHR1) 遺伝子、プレプロアグーチ関連ペプチド遺伝子、スルホニルウレア受容体遺伝子、毛様体神経栄養因子 (CNTF) 受容体遺伝子、1型ニューロメディンU受容体 (NMU1R) 遺伝子、1型オレキシン受容体 (OX1R) 遺伝子、2型オレキシン受容体 (OX2R) 遺伝子、1型アンジオテンシンII受容体遺伝子、ガラニン受容体、グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) 受容体遺伝子、およびグルカゴン様ペプチド-2 (GLP-2) 受容体遺伝子からなる群より選ばれる遺伝子の少なくとも1つの遺伝子を内因性に発現する視床下部由来細胞である、請求項1、2、6、7または8に記載のDNAの取得方法。

13. 内分泌細胞由来の細胞株が、レプチン受容体 (Ob-Rb)、ニューロメディンU、RFamide-related peptide (RFRP) 蛋白質、オレキシン、オピオメラノコルチン、ニューロペプチドY、ニューロペプチドFF、コルチコトロピン放出ホルモン、サイロトロピン放出ホルモン、グレリン、メラニン凝集ホルモン、cocaine-and amphetamine-regulated transcript (CART)、2型ニューロメディンU受容体 (NMU2R)、RFRP受容体、4型メラノコルチン受容体 (MC4R)、1型ニューロペプチドY受容体 (NPY1R)、5型ニューロペプチドY受容体 (NPY5R)、2型ニューロペプチドFF受容体 (NPFF2)、1型コルチコトロピン放出ホルモン受容体 (CRHR-1)、2型コルチコトロピン放出ホルモン受容体 (CRHR-2)、グレリン受容体、1型メラニン凝集ホルモン受容体 (MCHR1)、アグーチ関連ペプチド、スルホニルウレア受容体、毛様体神経栄養因子 (CNTF) 受容体、1型ニューロメディンU受容体 (NMU1R)、1型オレキシン受容体 (OX1R)、2型オレキシン受容体 (OX2R)、1型アンジオテンシンII受容体、ガラニン受容体、グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) 受容体、グルカゴン様ペプチド-2 (GLP-2) 受容体、およびエンドルフィンからなる群より選ばれるペプチドの少なくとも1つのペプチドを内因性に発現する視床下部由来の細胞である、請求項1、2、6、7または8に記載のDNAの取得方法。

14. 内分泌細胞由来の細胞株の細胞が、プレプロインスリン遺伝子、プレプログルカゴン遺伝子、プレプロソマトスタチン遺伝子、プレプロ胰ポリペプチド遺伝子、プロホルモンコンベルターゼ1 (PC1) 遺伝子、プロホルモンコンベルターゼ2 (PC2) 遺伝子、グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) 受容体遺伝子、PDX1 (

pancreatic-duodenal homeobox 1) 遺伝子、Pax4遺伝子、Pax6遺伝子、ニューロジェニン3遺伝子、ニューロD遺伝子、Nkx2.2遺伝子、Nkx6.1遺伝子、グルコキナーゼ遺伝子、2型グルコーストランスポーター遺伝子、ベータセルリン遺伝子、スルホニルウレア遺伝子、P2Y₁受容体遺伝子、グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) 受容体遺伝子、1型ソマトスタチン受容体遺伝子、2型ソマトスタチン受容体遺伝子、3型ソマトスタチン受容体遺伝子、4型ソマトスタチン受容体遺伝子、5型ソマトスタチン受容体遺伝子、インスリン受容体遺伝子、グルコーストランスポーター遺伝子、およびネスチン遺伝子からなる群より選ばれる遺伝子の少なくとも1つの遺伝子を内因性に発現するランゲルハンス氏島由来細胞である、請求項1、2、6、7または8に記載のDNAの取得方法。

15. 受容体を発現する細胞が、下記の (1) ~ (3) の少なくとも1つが染色体DNAに組み込まれた、エプスタイン・バー・ウイルス (Epstein-Barr virus) のEBNA-1遺伝子を発現する無血清馴化したB細胞株である、請求項1または2に記載のDNAの取得方法。

- (1) 誘導発現系の構築に必要な転写因子を発現するためのDNAコンストラクト
- (2) 転写因子の応答配列を有するプロモーターの下流にレポーター遺伝子を連結したDNAコンストラクト
- (3) G α 蛋白質またはキメラG α 蛋白質を発現するためのDNAコンストラクト

16. B細胞株が、無血清馴化Namalwa細胞である、請求項15に記載のDNAの取得方法。

17. 無血清馴化Namalwa細胞が、Namalwa KJM-1細胞である、請求項16に記載のDNAの取得方法。

18. 誘導発現系の構築に必要な転写因子が、酵母のGal4pとエストロジェン受容体のリガンド結合領域のキメラ蛋白質である、請求項15に記載のDNAの取得方法。

19. 転写因子の応答配列が、cAMP応答配列 (CRE)、TPA応答配列 (TRE)、NFAT(nuclear factor of activated T cells)応答配列、または血清応答配列 (SRE)である、請求項15に記載のDNAの取得方法。

20. レポーター遺伝子が、ホタル・ルシフェラーゼ遺伝子、ウミシイタケ・ルシフェラーゼ遺伝子、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子、 β -ラクタマーゼ遺伝子、またはグリーン・フ

ルオレッセント・プロテイン遺伝子である、請求項15に記載のDNAの取得方法。

21. $G\alpha$ 蛋白質が、 $G\alpha_{16}$ 、 $G\alpha_{15}$ 、 $G\alpha_q$ 、 $G\alpha_{11}$ 、 $G\alpha_s$ 、 $G\alpha_i$ 、 $G\alpha_o$ 、 $G\alpha_z$ 、 $G\alpha_{12}$ 、 $G\alpha_{13}$ 、 $G\alpha_{\text{gust}}$ 、 $G\alpha_t$ 、および $G\alpha_{14}$ からなる群より選ばれるの少なくとも1つの $G\alpha$ 蛋白質である、請求項15に記載のDNAの取得方法。

22. キメラ $G\alpha$ 蛋白質が、下記の(1)～(20)からなる群より選ばれる少なくとも1つのキメラ $G\alpha$ 蛋白質である、請求項15に記載のDNAの取得方法。

- (1) $G\alpha_s$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_q$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- (2) $G\alpha_s$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_i$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- (3) $G\alpha_s$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_o$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- (4) $G\alpha_s$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_z$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- (5) $G\alpha_s$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_{12}$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- (6) $G\alpha_s$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_{13}$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- (7) $G\alpha_s$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_{\text{gust}}$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- (8) $G\alpha_s$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_t$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- (9) $G\alpha_s$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_{14}$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- (10) $G\alpha_s$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_{16}$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- (11) $G\alpha_q$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_s$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- (12) $G\alpha_q$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_i$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- (13) $G\alpha_q$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_o$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- (14) $G\alpha_q$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_z$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- (15) $G\alpha_q$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_{12}$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- (16) $G\alpha_q$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_{13}$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- (17) $G\alpha_q$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_{\text{gust}}$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質

- (18) $G\alpha_q$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_t$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- (19) $G\alpha_q$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_{14}$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- (20) $G\alpha_q$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_{16}$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質

23. 誘導発現系の構築に必要な転写因子が、酵母のGal4pとエストロジェン受容体のリガンド結合領域のキメラ蛋白質であり、転写因子の応答配列を有するプロモーターが、cAMP応答配列(CRE)を有するプロモーターであり、レポーター遺伝

子が、ホタル・ルシフェラーゼ遺伝子またはウミシイタケ・ルシフェラーゼ遺伝子である、請求項15に記載のDNAの取得方法。

24. 誘導発現系の構築に必要な転写因子が、酵母のGal4pとエストロジェン受容体のリガンド結合領域のキメラ蛋白質であり、転写因子の応答配列を有するプロモーターが、cAMP応答配列(CRE)を有するプロモーターであり、レポーター遺伝子が、ホタル・ルシフェラーゼ遺伝子またはウミシイタケ・ルシフェラーゼ遺伝子であり、キメラGα蛋白質が、Gα_sのC末端5アミノ酸をGα_qのC末端5アミノ酸に置換したキメラGα蛋白質またはGα_sのC末端5アミノ酸をGα_iのC末端5アミノ酸に置換したキメラGα蛋白質である、請求項15に記載のDNAの取得方法。

25. 細胞の応答反応が、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺上昇、細胞内cAMP生成、細胞内cAMP減少、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos活性化、細胞内pHの変動、細胞増殖、レポーター遺伝子の発現量、およびマーカー遺伝子の発現量からなる群より選ばれる少なくとも1つの応答反応である、請求項1または2に記載のDNAの取得方法。

26. 目的とする受容体を発現する細胞との接触が、該細胞を形質転換株上に重層することによる接触である、請求項1または2に記載のDNAの取得方法。

27. レプチン受容体 (Ob-Rb) 遺伝子、プレプロニューロメディンU遺伝子、RFamide-related peptide (RFRP) プレプロ蛋白質遺伝子、プレプロオレキシン遺伝子、プレプロオピオメラノコルチン遺伝子、プレプロニューロペプチドY遺伝子、プレプロニューロペプチドFF遺伝子、プレプロコルチコトロピン放出ホルモン遺伝子、プレプロサイロトロピン放出ホルモン遺伝子、プレプログレリン遺伝子、プレプロメラニン凝集ホルモン遺伝子、cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) 遺伝子、2型ニューロメディンU受容体 (NMU2R) 遺伝子、RFRP受容体遺伝子、4型メラノコルチン受容体 (MC4R) 遺伝子、1型ニューロペプチドY受容体 (NPY1R) 遺伝子、5型ニューロペプチドY受容体 (NPY5R) 遺伝子、2型ニューロペプチドFF受容体 (NPFF2) 遺伝子、1型コルチコトロピン放出ホルモン受容体 (CRHR-1) 遺伝子、2型コルチコトロピン放出ホルモン受容体 (CRHR-2) 遺伝子、グレリン受容体遺伝子、1型メラニン凝集ホルモン受容体 (MCHR1) 遺伝子、プレプロアグーチ関連ペプチド遺伝子、スルホニルウレア受容体遺伝子、

毛様体神経栄養因子 (CNTF) 受容体遺伝子、1型ニューロメディンU受容体 (NMU1R) 遺伝子、1型オレキシン受容体 (OX1R) 遺伝子、2型オレキシン受容体 (OX2R) 遺伝子、1型アンジオテンシンII受容体遺伝子、ガラニン受容体遺伝子、グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) 受容体遺伝子、およびグルカゴン様ペプチド-2 (GLP-2) 受容体遺伝子からなる群より選ばれる遺伝子の少なくとも1つの遺伝子を内因性に発現する視床下部由来の細胞株。

28. レプチン受容体 (Ob-Rb)、ニューロメディンU、RFamide-related peptide (RFRP) 蛋白質、オレキシン、オビオメラノコルチン、ニューロペプチドY、ニューロペプチドFF、コルチコトロピン放出ホルモン、サイロトロピン放出ホルモン、グレリン、メラニン凝集ホルモン、cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART)、2型ニューロメディンU受容体 (NMU2R)、RFRP受容体、4型メラノコルチン受容体 (MC4R)、1型ニューロペプチドY受容体 (NPY1R)、5型ニューロペプチドY受容体 (NPY5R)、2型ニューロペプチドFF受容体 (NPFF2)、1型コルチコトロピン放出ホルモン受容体 (CRHR-1)、2型コルチコトロピン放出ホルモン受容体 (CRHR-2)、グレリン受容体、1型メラニン凝集ホルモン受容体 (MCHR1)、アグーチ関連ペプチド、スルホニルウレア受容体、毛様体神経栄養因子 (CNTF) 受容体、1型ニューロメディンU受容体 (NMU1R)、1型オレキシン受容体 (OX1R)、2型オレキシン受容体 (OX2R)、1型アンジオテンシンII受容体、ガラニン受容体、グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) 受容体、グルカゴン様ペプチド-2 (GLP-2) 受容体、およびエンドルフィンからなる群より選ばれるペプチドの少なくとも1つのペプチドを内因性に発現する視床下部由来の細胞株。

29. 細胞株が、SV40のラージT抗原遺伝子を発現する細胞株である、請求項27または28に記載の細胞株。

30. 細胞株が、SV40の温度感受性変異株のラージT抗原遺伝子を発現する細胞株である、請求項27または28に記載の細胞株。

31. 細胞株が、非ヒト・トランスジェニック動物細胞由来の細胞株である、請求項27～30のいずれか1項に記載の細胞株。

32. SV40の温度感受性変異株のラージT抗原遺伝子を導入した非ヒト・トランスジェニック動物の視床下部またはランゲルハンス氏島から得られる不死化した細胞株。

33. ランゲルハンス氏島から得られる不死化した細胞株が、プレプロインスリン遺伝子、プレプログルカゴン遺伝子、プレプロソマトスタチン遺伝子、プレプロ膵ポリペプチド遺伝子、プロホルモンコンベルターゼ1 (PC1) 遺伝子、プロホルモンコンベルターゼ2 (PC2) 遺伝子、グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) 受容体遺伝子、PDX1 (pancreatic-duodenal homeobox 1) 遺伝子、Pax4遺伝子、Pax6遺伝子、ニューロジェニン3遺伝子、ニューロD遺伝子、Nkx2.2遺伝子、Nkx6.1遺伝子、グルコキナーゼ遺伝子、2型グルコーストランスポーター遺伝子、ベータセルリン遺伝子、スルホニルウレア遺伝子、P2Y₁受容体遺伝子、グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) 受容体遺伝子、1型ソマトスタチン受容体遺伝子、2型ソマトスタチン受容体遺伝子、3型ソマトスタチン受容体遺伝子、4型ソマトスタチン受容体遺伝子、5型ソマトスタチン受容体遺伝子、インスリン受容体遺伝子、グルコーストランスポーター遺伝子、およびネスチン遺伝子からなる群より選ばれる遺伝子の少なくとも1つの遺伝子を内因性に発現する細胞株である、請求項32に記載の細胞株。

34. SV40の温度感受性変異株がSV40tsA58である請求項30または32に記載の細胞株。

35. 非ヒト・トランスジェニック動物がトランスジェニックラットである請求項31または32に記載の細胞株。

36. 下記 (1) および (2) の工程を有する、ペプチドの製造方法。

(1) 請求項27～35のいずれか1項に記載の細胞株を培養し、該細胞株が内在的に発現しているペプチドを培養物中に生成蓄積させる

(2) 上記 (1) で得られた培養物から該ペプチドを採取する

37. 下記 (1) ～ (3) の工程を有する、ペプチドの製造方法。

(1) 請求項27～35のいずれか1項に記載の細胞株を宿主細胞として用い、該宿主細胞に目的とするペプチドをコードするDNAを導入し、形質転換株を取得する

(2) 該形質転換株を培養し、培養物中にペプチドを生成蓄積させる

(3) 上記 (2) で得られた培養物から該ペプチドを採取する

38. 培養を、SV40の温度感受性変異株のラージT抗原の活性を抑制しない温度で行うことを特徴とする、請求項36または37に記載の製造法。

39. 製造において、無血清培地、2%以下の血清を含む培地、または無血清培

地にN-サプリメントを添加した培地を用いて培養を行う工程を有することを特徴とする、請求項36～38のいずれか1項に記載の製造法。

40. 製造において、5～30mmol/Lのグルコースを含有する培地を用いて培養を行う工程を有することを特徴とする、請求項36～39のいずれか1項に記載の製造法。

41. 製造において、宿主細胞で発現されている、受容体、トランスポーターまたはチャネルの、アゴニストまたはアンタゴニストを添加した培地を用いて培養を行う工程を有することを特徴とする、請求項36～40のいずれか1項に記載の製造法。

42. 受容体が、G蛋白質共役型受容体、核内受容体、増殖因子受容体、スルホニルウレア受容体、ciliary neurotrophic factor受容体、レプチン受容体、サイトカイン受容体、またはスルホニルウレア受容体であることを特徴とする、請求項41に記載の製造法。

43. トランスポーターがグルコーストランスポーターであることを特徴とする、請求項41に記載の製造法。

44. チャネルが、Caチャネル、K⁺チャネル、Cl⁻チャネルまたはNaチャネルであることを特徴とする、請求項41に記載の製造法。

45. 製造において、宿主細胞で発現されている受容体のシグナルを代替することのできる物質を添加した培地を用いて培養を行う工程を有することを特徴とする、請求項36～44のいずれか1項に記載の製造法。

46. 受容体のシグナルを代替することのできる物質が、アデニレートシクラーゼ、プロテインキナーゼ、ホスホジエステラーゼ、低分子量G蛋白質、細胞内cAMPまたは細胞内Ca²⁺含量を変動する物質、フォルスコリン、8-プロモ-サイクリックAMP (8-Br-cAMP)、ホルボール12-ミリステート13-アセテート (PMA)、イオノマイシンおよび3-イソブチル-1-メチルキサンチンよりなる群より選ばれる物質の少なくとも1つの物質である、請求項45に記載の製造法。

47. 製造において、ラミニンまたはゼラチンをコートしたディッシュ上で培養を行う工程を有することを特徴とする、請求項36～46のいずれか1項に記載の製造法。

48. スクシニル化コンカナバリンAを添加した培地を用いて培養を行うことを

特徴とする、請求項36～46のいずれか1項に記載の製造法。

49. アクチビン、グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1)、フォリスタチン、グルコース、肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor)、上皮増殖因子 (epidermal growth factor)、ニコチンアミド、ベータセルリン、副甲状腺ホルモン関連ペプチド (parathyroid hormone-related peptide)、甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン (thyrotropin-releasing hormone)、血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor)、islet neogenesis-associated protein、血小板由来増殖因子 (Platelet-derived growth factor)、インシュリン様増殖因子I (insulin-like growth factor I)、繊維芽細胞増殖因子 (fibroblast growth factor)、神経成長因子 (nerve growth factor) およびReg蛋白質からなる群より選ばれる物質の少なくとも1つの物質を添加した培地を用いて培養を行うことを特徴とする、請求項36～48のいずれか1項に記載の製造法。

50. 培養物中に活性ペプチドを生成蓄積させた後に分泌刺激剤を添加することを特徴とする、請求項36～49のいずれか1項に記載の製造法。

51. 分泌刺激剤が、カリウム、グルコース、TolbutamideまたはATPである、請求項50に記載の製造法。

52. 一種類以上のペプチドをコードするDNAを宿主細胞に導入し、複数のペプチドを製造することを特徴とする、請求項37～51のいずれか1項に記載の製造法。

53. 下記 (1) ～ (4) の工程を有する、目的とする受容体のアゴニスト、アンタゴニストまたはインバースアゴニストとして作用するペプチドの検出または取得方法。

(1) 請求項1～26のいずれか1項に記載の方法で、目的とする受容体のアゴニスト、アンタゴニストまたはインバースアゴニストとして作用するペプチドをコードするDNAを取得する

(2) 該DNAがコードするペプチドまたは部分ペプチドを、目的とする受容体を発現する細胞と接触させる

(3) 該受容体に基づく細胞の応答反応を検出する

(4) 上記 (3) で応答反応を与えることの示されたペプチドまたは部分ペプチドを同定する

54. 下記 (1) ～ (4) の工程を有する、目的とする受容体のアゴニスト、アン

タゴニストまたはインバースアゴニストとして作用するペプチドの検出または取得方法。

- (1) 請求項36～52のいずれか1項に記載の製造方法でペプチドを取得する
- (2) 該ペプチドを、目的とする受容体を発現する細胞と接触させる
- (3) 該受容体に基づく細胞の応答反応を検出する
- (4) 上記(3)で応答反応を与えることの示されたペプチドを同定する

55. 受容体がG蛋白質共役型受容体である、請求項53または54に記載の検出または取得方法。

56. G蛋白質共役型受容体がオーファンG蛋白質共役型受容体である、請求項55に記載の検出または取得方法。

57. 受容体を発現する細胞が、下記の(1)～(3)の少なくとも1つが染色体DNAに組み込まれた、エプスタイン・バー・ウイルス (Epstein-Barr virus) のEBNA-1遺伝子を発現する無血清馴化したB細胞株である、請求項53または54に記載の検出または取得方法。

- (1) 誘導発現系の構築に必要な転写因子を発現するためのDNAコンストラクト
- (2) 転写因子の応答配列を有するプロモーターの下流にレポーター遺伝子を連結したDNAコンストラクト
- (3) G α 蛋白質またはキメラG α 蛋白質を発現するためのDNAコンストラクト

58. B細胞株が、無血清馴化Namalwa細胞である、請求項57に記載の検出または取得方法。

59. 無血清馴化Namalwa細胞が、Namalwa KJM-1細胞である、請求項58に記載の検出または取得方法。

60. 誘導発現系の構築に必要な転写因子が、酵母のGal4pとエストロゲン受容体のリガンド結合領域のキメラ蛋白質である、請求項57に記載の検出または取得方法。

61. 転写因子の応答配列が、cAMP応答配列(CRE)、TPA応答配列(TRE)、NFAT(nuclear factor of activated T cells)応答配列、または血清応答配列(SRE)である、請求項57に記載の検出または取得方法。

62. レポーター遺伝子が、ホタル・ルシフェラーゼ遺伝子、ウミシイタケ・ルシフェラーゼ遺伝子、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ遺伝

子、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子、 β -ラクタマーゼ遺伝子、またはグリーン・フルオレッセント・プロテイン遺伝子である、請求項57に記載の検出または取得方法。

63. $G\alpha$ 蛋白質が、 $G\alpha_{16}$ 、 $G\alpha_{15}$ 、 $G\alpha_q$ 、 $G\alpha_{11}$ 、 $G\alpha_s$ 、 $G\alpha_i$ 、 $G\alpha_o$ 、 $G\alpha_z$ 、 $G\alpha_{12}$ 、 $G\alpha_{13}$ 、 $G\alpha_{\text{gust}}$ 、 $G\alpha_t$ 、および $G\alpha_{14}$ からなる群より選ばれるの少なくとも1つの $G\alpha$ 蛋白質である、請求項57に記載の検出または取得方法。

64. キメラ $G\alpha$ 蛋白質が、下記の(1)～(20)からなる群より選ばれる少なくとも1つのキメラ $G\alpha$ 蛋白質である、請求項57に記載の検出または取得方法。

- (1) $G\alpha_s$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_q$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- (2) $G\alpha_s$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_i$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- (3) $G\alpha_s$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_o$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- (4) $G\alpha_s$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_z$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- (5) $G\alpha_s$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_{12}$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- (6) $G\alpha_s$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_{13}$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- (7) $G\alpha_s$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_{\text{gust}}$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- (8) $G\alpha_s$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_t$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- (9) $G\alpha_s$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_{14}$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- (10) $G\alpha_s$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_{16}$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- (11) $G\alpha_q$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_s$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- (12) $G\alpha_q$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_i$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- (13) $G\alpha_q$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_o$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- (14) $G\alpha_q$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_z$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- (15) $G\alpha_q$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_{12}$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- (16) $G\alpha_q$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_{13}$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- (17) $G\alpha_q$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_{\text{gust}}$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- (18) $G\alpha_q$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_t$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- (19) $G\alpha_q$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_{14}$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- (20) $G\alpha_q$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_{16}$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質

65. 誘導発現系の構築に必要な転写因子が、酵母のGal4pとエストロジェン受

容体のリガンド結合領域のキメラ蛋白質であり、転写因子の応答配列を有するプロモーターが、cAMP応答配列(CRE)を有するプロモーターであり、レポーター遺伝子が、ホタル・ルシフェラーゼ遺伝子またはウミシイタケ・ルシフェラーゼ遺伝子である、請求項57に記載の検出または取得方法。

66. 誘導発現系の構築に必要な転写因子が、酵母のGal4pとエストロジェン受容体のリガンド結合領域のキメラ蛋白質であり、転写因子の応答配列を有するプロモーターが、cAMP応答配列(CRE)を有するプロモーターであり、レポーター遺伝子が、ホタル・ルシフェラーゼ遺伝子またはウミシイタケ・ルシフェラーゼ遺伝子であり、キメラG α 蛋白質が、G α_s のC末端5アミノ酸をG α_q のC末端5アミノ酸に置換したキメラG α 蛋白質またはG α_s のC末端5アミノ酸をG α_i のC末端5アミノ酸に置換したキメラG α 蛋白質である、請求項57に記載の検出または取得方法。

67. 細胞の応答反応が、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺上昇、細胞内cAMP生成、細胞内cAMP減少、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos活性化、細胞内pHの変動、細胞増殖、レポーター遺伝子の発現量、およびマーカー遺伝子の発現量からなる群より選ばれる少なくとも1つの応答反応である、請求項53または54に記載の検出または取得方法。

68. 下記の(1)～(3)の少なくとも1つが染色体DNAに組み込まれた、エプスタイン・バー・ウイルス(Epstein-Barr virus)のEBNA-1遺伝子を発現する無血清馴化したB細胞株由来の細胞株。

(1) 誘導発現系の構築に必要な転写因子を発現するためのDNAコンストラクト

(2) 転写因子の応答配列を有するプロモーターの下流にレポーター遺伝子を連結したDNAコンストラクト

(3) G α 蛋白質またはキメラG α 蛋白質を発現するためのDNAコンストラクト

69. 細胞株が、無血清馴化Namalwa細胞である、請求項68に記載の細胞株。

70. 無血清馴化Namalwa細胞が、Namalwa KJM-1細胞である、請求項69に記載の細胞株。

71. 誘導発現系の構築に必要な転写因子が、酵母のGal4pとエストロジェン受容体のリガンド結合領域のキメラ蛋白質である、請求項68に記載の細胞株。

72. 転写因子の応答配列が、cAMP応答配列(CRE)、TPA応答配列(TRE)、

NFAT(nuclear factor of activated T cells)応答配列、または血清応答配列(SRE)である、請求項68に記載の細胞株。

73. レポーター遺伝子が、ホタル・ルシフェラーゼ遺伝子、ウミシイタケ・ルシフェラーゼ遺伝子、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子、 β -ラクタマーゼ遺伝子、またはグリーン・フルオレッセント・プロテイン遺伝子である、請求項68に記載の細胞株。

74. $G\alpha$ 蛋白質が、 $G\alpha_{16}$ 、 $G\alpha_{15}$ 、 $G\alpha_q$ 、 $G\alpha_{11}$ 、 $G\alpha_s$ 、 $G\alpha_i$ 、 $G\alpha_o$ 、 $G\alpha_z$ 、 $G\alpha_{12}$ 、 $G\alpha_{13}$ 、 $G\alpha_{gust}$ 、 $G\alpha_t$ 、および $G\alpha_{14}$ からなる群より選ばれるの少なくとも1つの $G\alpha$ 蛋白質である、請求項68に記載の細胞株。

75. キメラ $G\alpha$ 蛋白質が、下記の(1)～(20)からなる群より選ばれる少なくとも1つのキメラ $G\alpha$ 蛋白質である、請求項68に記載の細胞株。

- (1) $G\alpha_s$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_q$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- (2) $G\alpha_s$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_i$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- (3) $G\alpha_s$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_o$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- (4) $G\alpha_s$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_z$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- (5) $G\alpha_s$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_{12}$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- (6) $G\alpha_s$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_{13}$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- (7) $G\alpha_s$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_{gust}$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- (8) $G\alpha_s$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_t$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- (9) $G\alpha_s$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_{14}$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- (10) $G\alpha_s$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_{15}$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- (11) $G\alpha_q$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_s$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- (12) $G\alpha_q$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_i$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- (13) $G\alpha_q$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_o$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- (14) $G\alpha_q$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_z$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- (15) $G\alpha_q$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_{12}$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- (16) $G\alpha_q$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_{13}$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- (17) $G\alpha_q$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_{gust}$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質
- (18) $G\alpha_q$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_t$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質

(19) $G\alpha_q$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_{14}$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質

(20) $G\alpha_q$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_{16}$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質

76. 誘導発現系の構築に必要な転写因子が、酵母のGal4pとエストロジェン受容体のリガンド結合領域のキメラ蛋白質であり、転写因子の応答配列を有するプロモーターが、cAMP応答配列(CRE)を有するプロモーターであり、レポーター遺伝子が、ホタル・ルシフェラーゼ遺伝子またはウミシイタケ・ルシフェラーゼ遺伝子である、請求項68に記載の細胞株。

77. 誘導発現系の構築に必要な転写因子が、酵母のGal4pとエストロジェン受容体のリガンド結合領域のキメラ蛋白質であり、転写因子の応答配列を有するプロモーターが、cAMP応答配列(CRE)を有するプロモーターであり、レポーター遺伝子が、ホタル・ルシフェラーゼ遺伝子またはウミシイタケ・ルシフェラーゼ遺伝子であり、キメラ $G\alpha$ 蛋白質が、 $G\alpha_s$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_q$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質または $G\alpha_s$ のC末端5アミノ酸を $G\alpha_i$ のC末端5アミノ酸に置換したキメラ $G\alpha$ 蛋白質である、請求項68に記載の細胞株。

78. 下記(1)～(4)の工程を有する、被検物質に反応するペプチドをコードするDNAの取得方法。

(1) 請求項68～77のいずれか1項に記載の細胞株に、任意のcDNAまたは染色体由来のDNAを導入して形質転換株を取得する

(2) 導入したcDNAまたは染色体DNAを発現させた形質転換株を用いて、被検物質の存在下で該形質転換株の応答反応を測定する

(3) 導入したcDNAまたは染色体DNAを発現させた形質転換株を用いて、被検物質の非存在下で該形質転換株の応答反応を測定する

(4) 上記(2)と(3)の応答反応を比較し、異なる応答反応を示す形質転換株を選択し、該株に導入したDNAを同定する

79. 下記(1)～(7)の工程を有する、被検物質に反応するペプチドをコードするDNAの取得方法。

(1) 発現ベクターを用いて作製したcDNAライブラリーを1～10000のクローンずつのプールに分ける。

(2) 各プールに由来するcDNAクロンの混合物を、請求項68～77のいずれか1項に記載の細胞株に導入して形質転換株を取得する、

(3) 各プールごとに、導入したcDNAを発現させた形質転換株を用いて、被検物質の存在下で該形質転換株の応答反応を測定する

(4) 各プールごとに、導入したcDNAを発現させた形質転換株を用いて、被検物質の非存在下で該形質転換株の応答反応を測定する

(5) 上記(3)と(4)の応答反応を比較し、異なる応答反応を示すプールを選択し、選択したプールを(1)よりも細かいプールに分ける。

(6) (2)～(5)の操作をプールが1クローンごとになるまで繰り返す。

(7) 被検物質の存在下と非存在下で異なる応答反応を示す形質転換株を同定し、該株に導入したDNAを同定する

80. 細胞の応答反応が、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺上昇、細胞内cAMP生成、細胞内cAMP減少、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos活性化、細胞内pHの変動、細胞増殖、レポーター遺伝子の発現量、およびマーカー遺伝子の発現量からなる群より選ばれる少なくとも1つの応答反応である、請求項78または79に記載のDNAの取得方法。

81. 被検物質が、請求項27～35のいずれか1項に記載の細胞株を培養することにより得られる被検物質である、請求項78または79に記載のDNAの取得方法。

82. SV40の温度感受性変異株のラージT抗原の活性を抑制または消失させる温度で培養を行うことを特徴とする、請求項78～81のいずれか1項に記載のDNAの取得方法。

83. 下記(1)～(5)の工程を有する、ペプチドをコードするDNAの取得方法。

(1) 請求項68～77のいずれか1項に記載の細胞株から選ばれる、転写因子の応答配列を有するプロモーターの下流にレポーター遺伝子を連結したDNAコンストラクトが染色体DNAに組み込まれた細胞株を宿主細胞として選択する

(2) 該宿主細胞に、任意のcDNAまたは染色体由来のDNAを導入して形質転換株を取得する

(3) 上記(2)で取得された形質転換株において、導入したcDNAまたはDNAを発現させたときの、レポーター遺伝子の発現量を測定する

(4) 宿主細胞における、あるいは上記(2)で取得された形質転換株において、導入したcDNAまたはDNAを発現させていないときの、レポーター遺伝子の発現量を

測定する

(5) 上記 (3) と (4) のレポーター遺伝子の発現量を比較し、異なるレポーター遺伝子の発現量を示す形質転換株を選択し、該株に導入したDNAを同定する

84. 下記 (1) ~ (8) の工程を有する、ペプチドをコードするDNAの取得方法。

(1) 誘導発現ベクターを用いて作製したcDNAライブラリーを1~10000のクローンずつのプールに分ける

(2) 請求項68~77のいずれか1項に記載の細胞株から選ばれる、転写因子の応答配列を有するプロモーターの下流にレポーター遺伝子を連結したDNAコンストラクトが染色体DNAに組み込まれた細胞株を宿主細胞として選択する

(3) 上記 (1) で分けた、各プールに由来するcDNAクロンの混合物を、上記

(2) で取得した宿主細胞に導入して、各プールごとに形質転換株を取得する

(4) 上記 (3) の各プールごとの形質転換株において、導入したcDNAを発現させたときの、レポーター遺伝子の発現量を測定する

(5) 上記 (3) の各プールごとの形質転換株において、導入したcDNAを発現させないときの、レポーター遺伝子の発現量を測定する

(6) 上記 (4) および (5) のレポーター遺伝子の発現量をプールごとに比較し、

(4) のレポーター遺伝子の発現量の多いプールの形質転換株を選択し、選択したプールを (1) よりも細かいプールに分ける

(7) 上記 (2) ~ (6) の操作をプールが1クローンごとになるまで繰り返す

(8) 導入したcDNAを、発現させないときよりも発現させたときのレポーター遺伝子の発現量の多い形質転換株を同定し、該株に導入したDNAを同定する

85. ペプチドが、受容体、転写因子、シグナル伝達分子、または酵素である、請求項78、79、83または84に記載のDNAの取得方法。

86. 受容体がG蛋白質共役型受容体である、請求項85に記載のDNAの取得方法。

87. 受容体が構成活性型のG蛋白質共役型受容体である、請求項85に記載のDNAの取得方法。

88. G蛋白質共役型受容体がオーファンG蛋白質共役型受容体である、請求項86または87に記載のDNAの取得方法。

89. ペプチドが、転写因子の応答配列を有するプロモーターの活性を増加させる活性を有する転写因子、シグナル伝達分子、または酵素である、請求項78、79、

83または84に記載のDNAの取得方法。

90. cDNAが変異G蛋白質共役型受容体をコードするランダム変異導入cDNA、ペプチドが構成活性型変異G蛋白質共役型受容体あることを特徴とする、請求項78、79、83または84に記載のDNAの取得方法。

91. ランダム変異を導入する部位が、G蛋白質共役型受容体の第3膜貫通領域の後半から第2細胞内領域の前半部分あるいは第3細胞内領域の後半から第6膜貫通領域の前半部分であることを特徴とする、請求項90に記載のDNAの取得方法。

92. ランダム変異を導入する部位が、G蛋白質共役型受容体における保存アミノ酸残基の一つである第6膜貫通領域中に存在するプロリン残基もしくは該プロリン残基に相応するアミノ酸残基よりN末側に20残基目または22残基目のアミノ酸であることを特徴とする、請求項90または91に記載のDNAの取得方法。

93. 請求項90～92のいずれか1項に記載の方法を用いて取得される構成活性型変異G蛋白質共役型受容体。

94. G蛋白質共役型受容体における保存アミノ酸残基の一つである第6膜貫通領域中に存在するプロリン残基もしくは該プロリン残基に相応するアミノ酸残基よりN末側に20残基目または22残基目のアミノ酸に変異を有する構成活性型変異G蛋白質共役型受容体。

95. OGR1のN末端より221番目のセリンをアスパラギンに置換した構成活性型変異G蛋白質共役型受容体、OGR1のN末端より118番目のアスパラギン酸をアラニンに置換した構成活性型変異G蛋白質共役型受容体、OGR1のN末端より118番目のアスパラギン酸をアラニンに、かつ221番目のセリンをアスパラギンに置換した構成活性型変異G蛋白質共役型受容体、RE2のN末端より124番目のアスパラギン酸をアラニンに置換した構成活性型変異G蛋白質共役型受容体、GPR35のN末端より113番目のアスパラギン酸をアラニンに置換した構成活性型変異G蛋白質共役型受容体、GPCR25のN末端より111番目のアスパラギン酸をアラニンに置換した構成活性型変異G蛋白質共役型受容体、PGM0334のN末端より135番目のグルタミン酸をフェニルアラニン、グルタミンまたはアラニンに置換した構成活性型変異G蛋白質共役型受容体、PGM0334のN末端より259番目のアスパラギン酸をセリンに置換した構成活性型変異G蛋白質共役型受容体、GPR43のN末端より217番目のアルギニンをプロリンに置換した構成活性型変異G蛋白質共役型受容体、およびGPR43のN末端より217番

目のアルギニンをプロリンに、かつ106番目のグルタミン酸をアスパラギン酸に置換した構成活性型変異G蛋白質共役型受容体からなる群より選ばれる構成活性型変異G蛋白質共役型受容体。

96. 1型メラノコルチン受容体 (MC1R) および、proadrenomedullin N-20 terminal peptide (PAMP) またはPAMPのN末端から9~20番目のアミノ酸残基からなるペプチドを用いた、MC1Rのアンタゴニストの探索法または取得法。

97. オーフアンG蛋白質共役型受容体GPR43および、酢酸、プロピオン酸、酢酸塩、またはプロピオン酸塩を用いた、GPR43のアンタゴニストの探索法または取得法。

98. オーフアンG蛋白質共役型受容体GPR41および、シクロプロパンカルボン酸、プロピオン酸、シクロプロパンカルボン酸塩、またはプロピオン酸塩を用いた、GPR41のアンタゴニストの探索法または取得法。

99. オーフアンG蛋白質共役型受容体G10dおよび、 α -メラノサイト刺激ホルモンまたは副腎皮質刺激ホルモンを用いた、G10dのアンタゴニストの探索法または取得法。

100. 下記 (1) ~ (4) の工程を有する、G蛋白質共役型受容体のアゴニストの取得法。

(1) 請求項68~77のいずれか1項に記載の細胞株に、任意のG蛋白質共役型受容体をコードするDNA導入して形質転換株を取得する

(2) 導入したDNAを発現させた形質転換株を用いて、被検物質の存在下で該形質転換株の応答反応を測定する

(3) 導入したDNAを発現させた形質転換株を用いて、被検物質の非存在下で該形質転換株の応答反応を測定する

(4) 上記 (2) と (3) を比較し、応答反応の変化を誘発する被検物質をアゴニストとして取得する

101. 下記 (1) ~ (4) の工程を有する、G蛋白質共役型受容体のアンタゴニストの取得法。

(1) 請求項68~77のいずれか1項に記載の細胞株に、任意のG蛋白質共役型受容体をコードするDNA導入して形質転換株を取得する

(2) 導入したDNAを発現させた形質転換株を用いて、該G蛋白質共役型受容体のア

ゴニストの存在下で該形質転換株の応答反応を測定する

(3) 導入したDNAを発現させた形質転換株を用いて、該G蛋白質共役型受容体のアゴニストと被検物質の存在下で該形質転換株の応答反応を測定する

(4) アゴニストに基づく該形質転換株の応答反応を消失させる被検物質をアンタゴニストとして取得する

102. 細胞の応答反応が、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺上昇、細胞内cAMP生成、細胞内cAMP減少、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos活性化、細胞内pHの変動、細胞増殖、レポーター遺伝子の発現量、およびマーカー遺伝子の発現量からなる群より選ばれる少なくとも1つの応答反応である、請求項100または101に記載のG蛋白質共役型受容体のアゴニストまたはアンタゴニストの取得法。

103. 下記(1)～(5)の工程を有する、G蛋白質共役型受容体のアンタゴニストまたはインバースアゴニストの取得法。

(1) 請求項68～77のいずれか1項に記載の細胞株から選ばれる、転写因子の応答配列を有するプロモーターの下流にレポーター遺伝子を連結したDNAコンストラクトが染色体DNAに組み込まれた細胞株を宿主細胞として選択する

(2) 該宿主細胞に、任意の構成活性型G蛋白質共役型受容体をコードするDNAを導入して形質転換株を取得する

(3) 被検物質の非存在下、導入したDNAを発現させた形質転換株でのレポーター遺伝子の発現量を測定する

(4) 被検物質の存在下、導入したDNAを発現させた形質転換株でのレポーター遺伝子の発現量を測定する

(5) 上記(3)および(4)のレポーター遺伝子の発現量を比較し、レポーター遺伝子の発現量を低下させる被検物質を、(2)のG蛋白質共役型受容体のアンタゴニストまたはインバースアゴニストとして取得する

104. 下記(1)～(4)の工程を有する、転写因子、シグナル伝達分子および酵素からなる群より選ばれるペプチドの活性化剤または阻害剤の取得法。

(1) 請求項68～77のいずれか1項に記載の細胞株に、任意の転写因子、シグナル伝達分子および酵素からなる群より選ばれるペプチドをコードするDNAを導入して形質転換株を取得する

(2) 導入したDNAを発現させた形質転換株を用いて、被検物質の非存在下で該形質転換株の応答反応を測定する

(3) 導入したDNAを発現させた形質転換株を用いて、被検物質の存在下で該形質転換株の応答反応を測定する

(4) 上記(2)と(3)を比較し、応答反応を変動させる被検物質を、該ペプチドの活性化剤または阻害剤として取得する

105. 細胞の応答反応が、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺上昇、細胞内cAMP生成、細胞内cAMP減少、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos活性化、細胞内pHの変動、細胞増殖、レポーター遺伝子の発現量、およびマーカー遺伝子の発現量からなる群より選ばれる少なくとも1つの応答反応である、請求項104に記載の取得法。

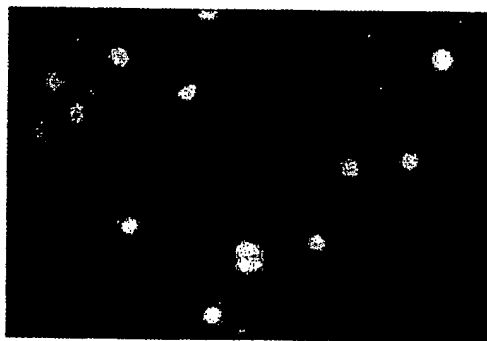
106. 宿主細胞として請求項68~77のいずれか1項に記載の細胞株を、ベクターとして任意のプロモーターとエプスタイン・バー・ウイルス (Epstein-Barr virus) のoriPを有する発現ベクターを用いることを特徴とする、宿主・ベクター系。

107. 任意のプロモーターがGal4p応答性の誘導発現プロモーターである、請求項106に記載の宿主・ベクター系。

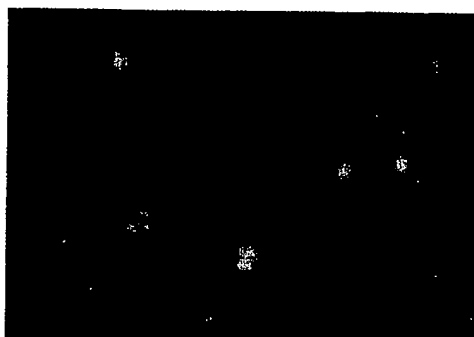
108. 発現ベクターが、pAMo、pAMo-nd、pAMo-d、pAGal9-nd、またはpAGal9-dであることを特徴とする、請求項106または107に記載の宿主・ベクター系。

第1図

(a).

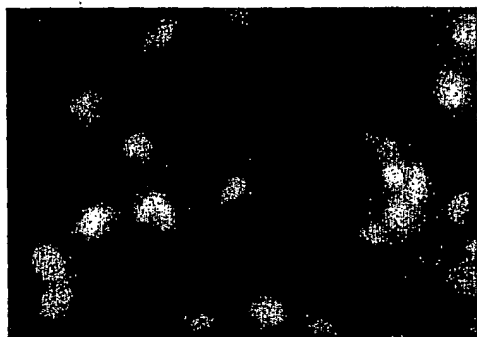


(b).

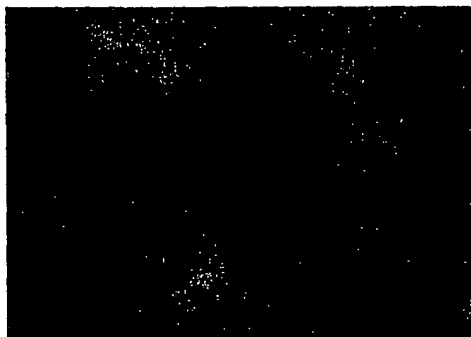


第2図

(a)

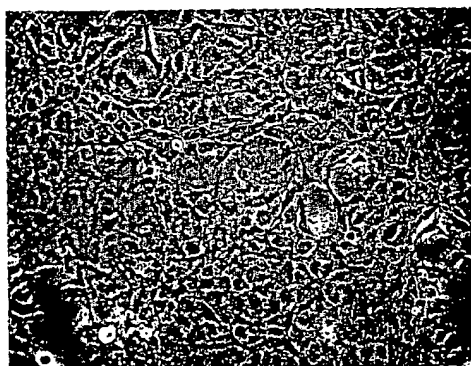


(b)

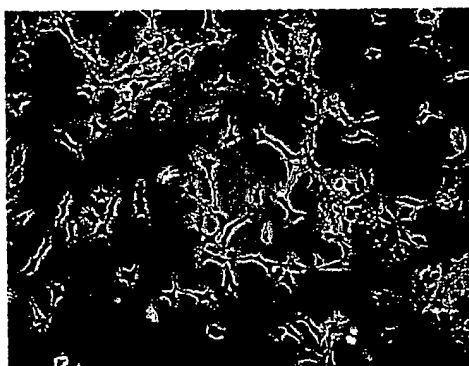


第3図

(a)

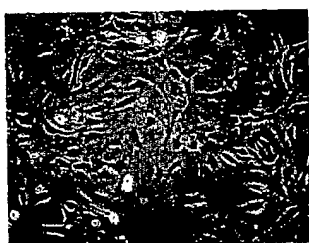


(b)



第4図

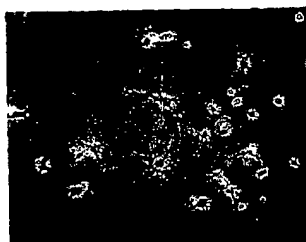
(a)



(b)

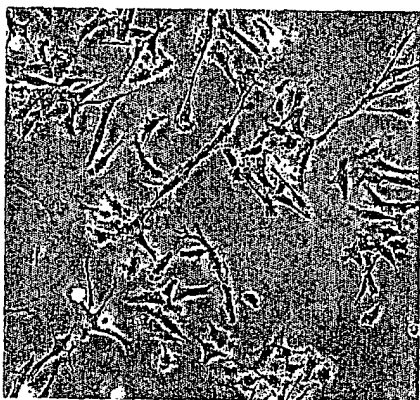


(c)

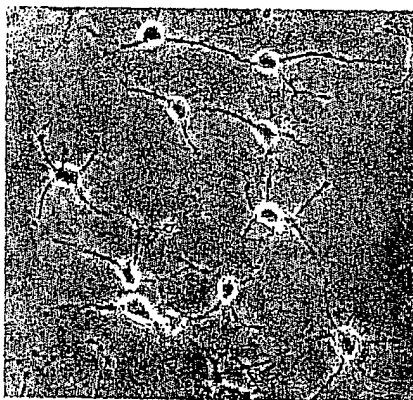


第5図

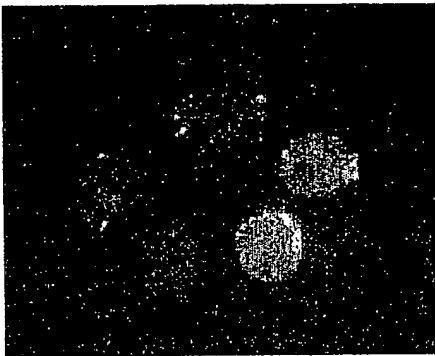
(a)



(b)



第6図

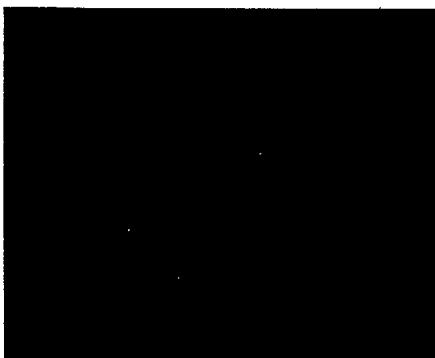


第7図

(a)



(b)

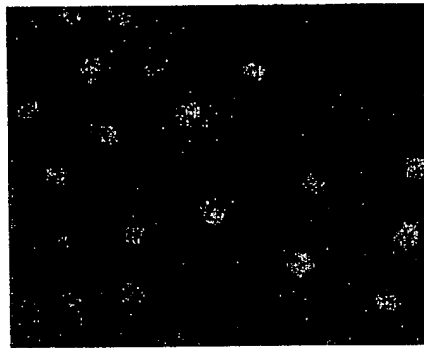


第8図

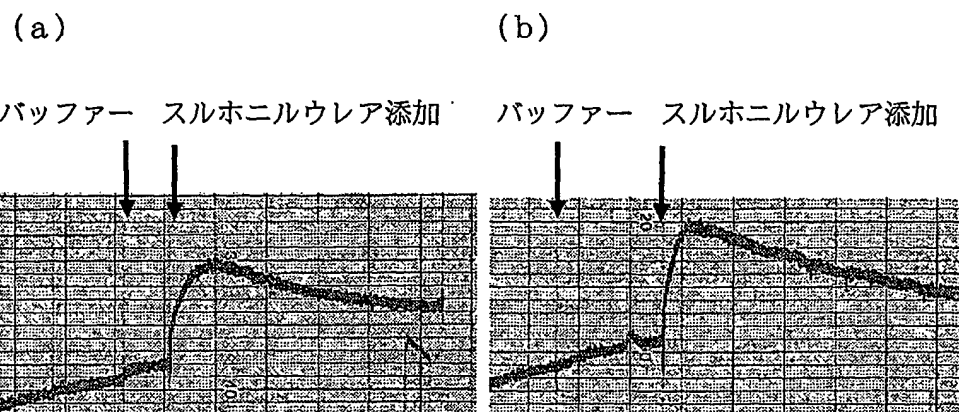
(a)



(b)



第9図

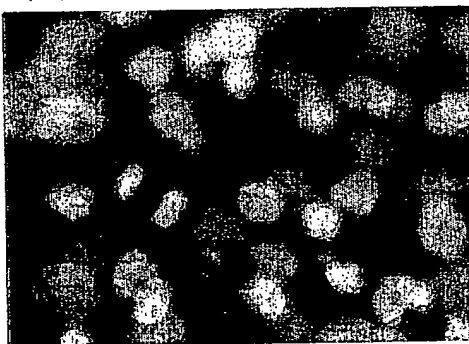


第10図

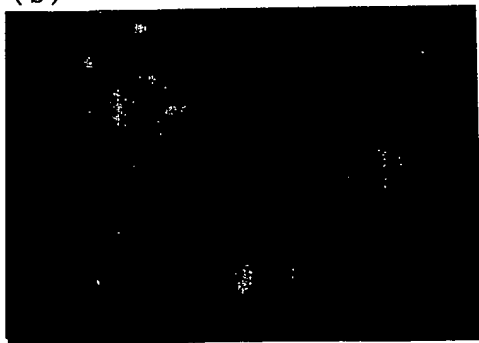
(a)



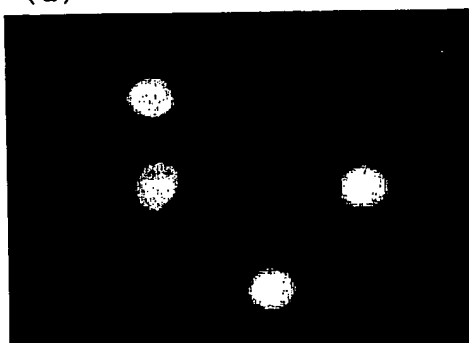
(c)



(b)

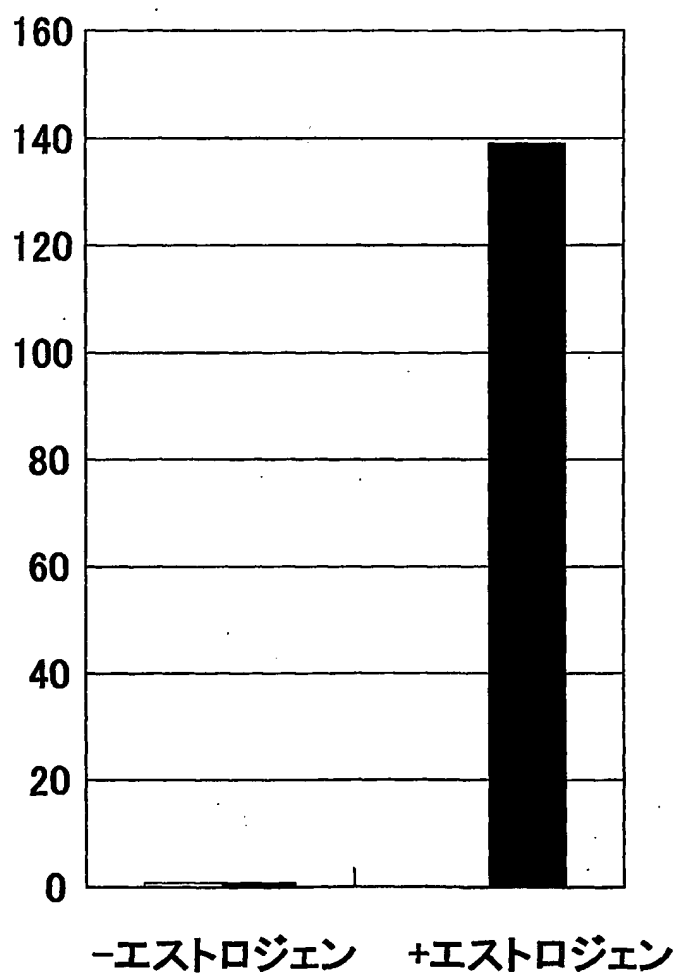


(d)

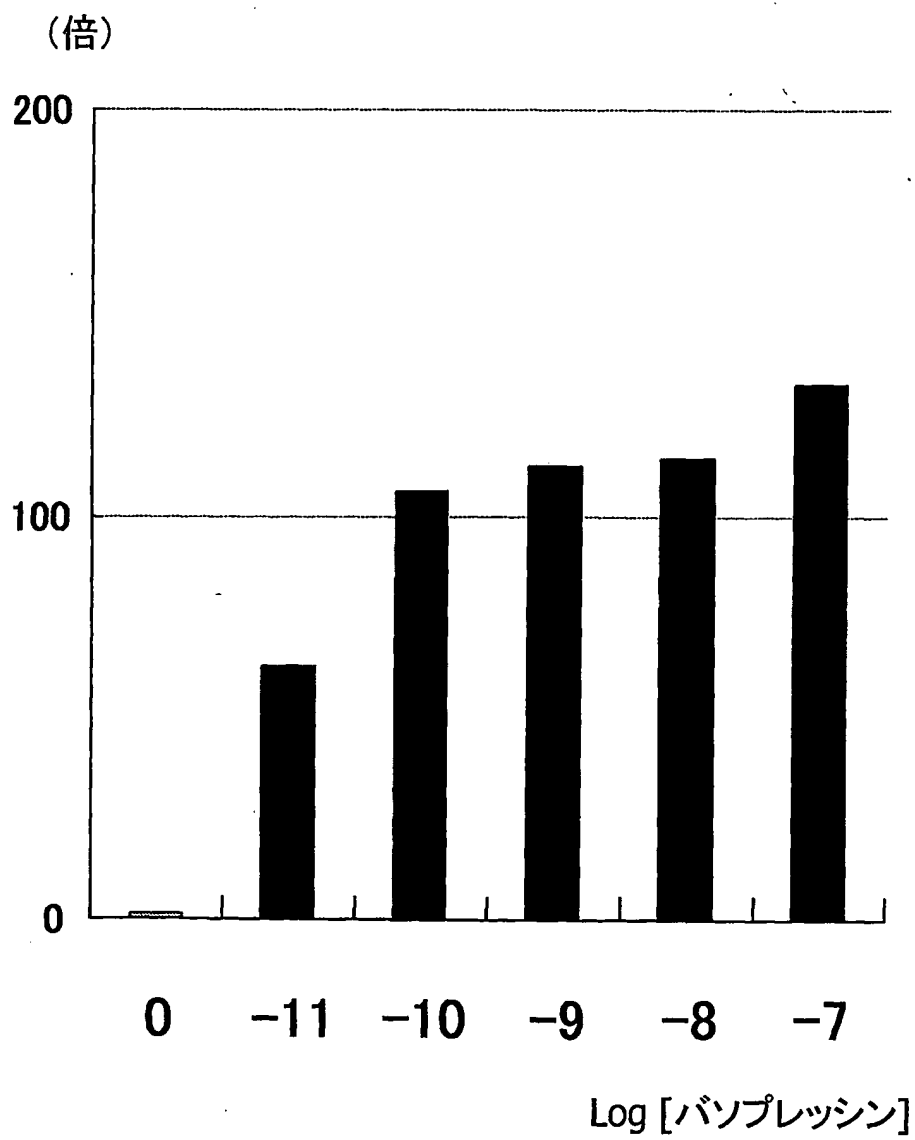


第11図

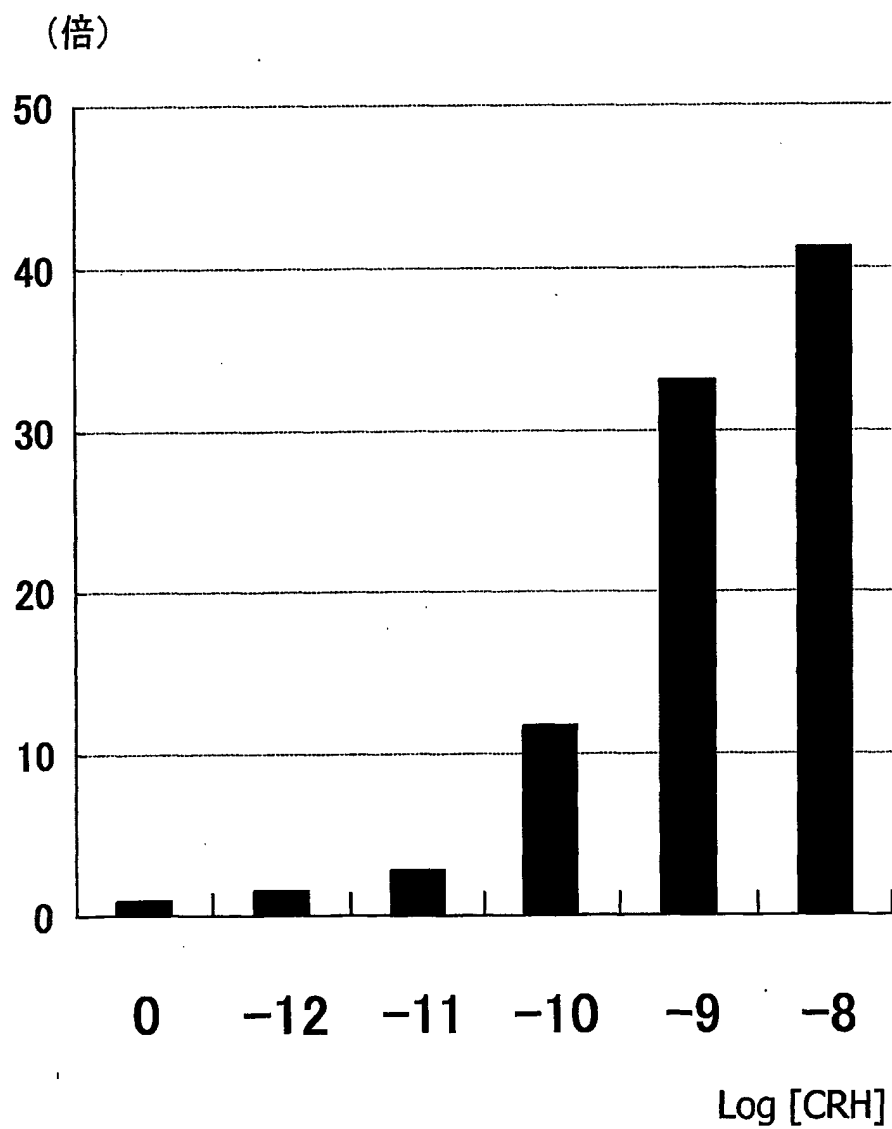
(倍)



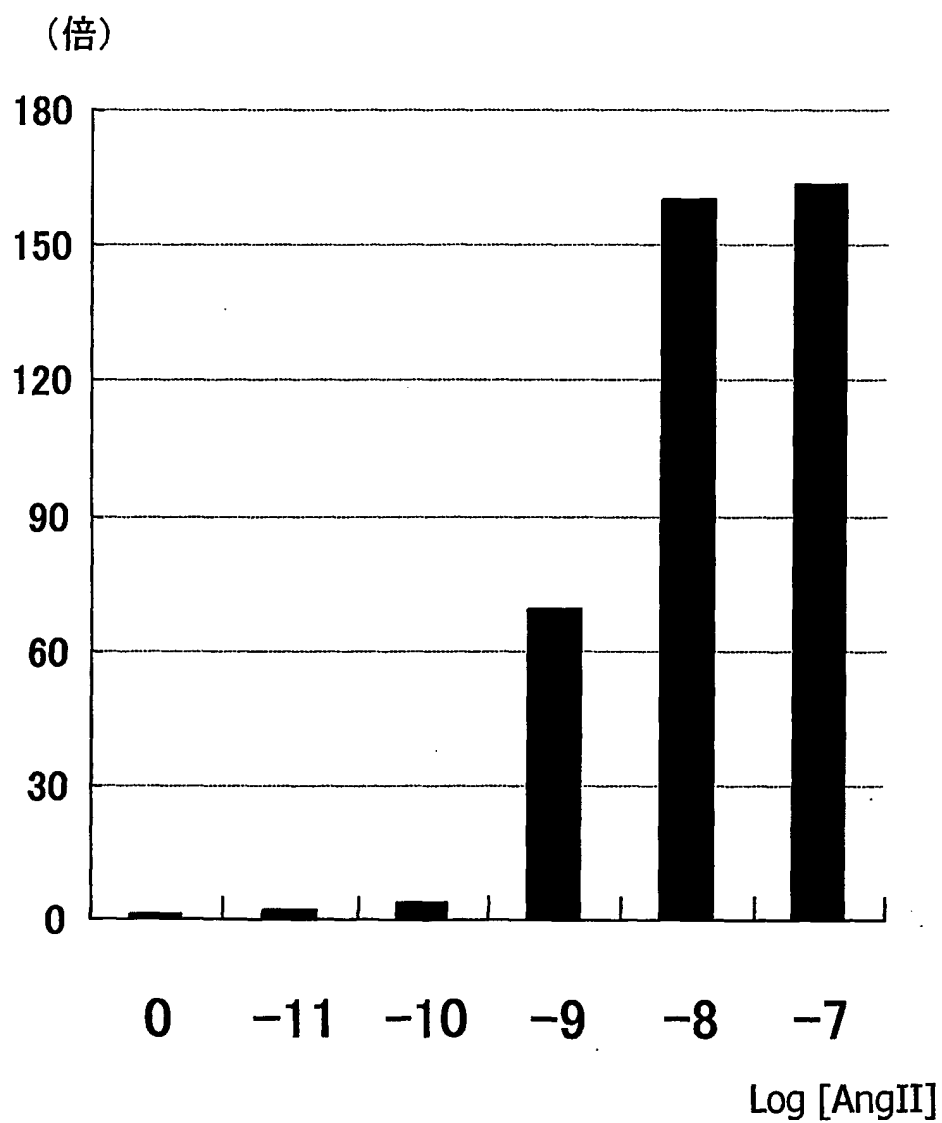
第12図



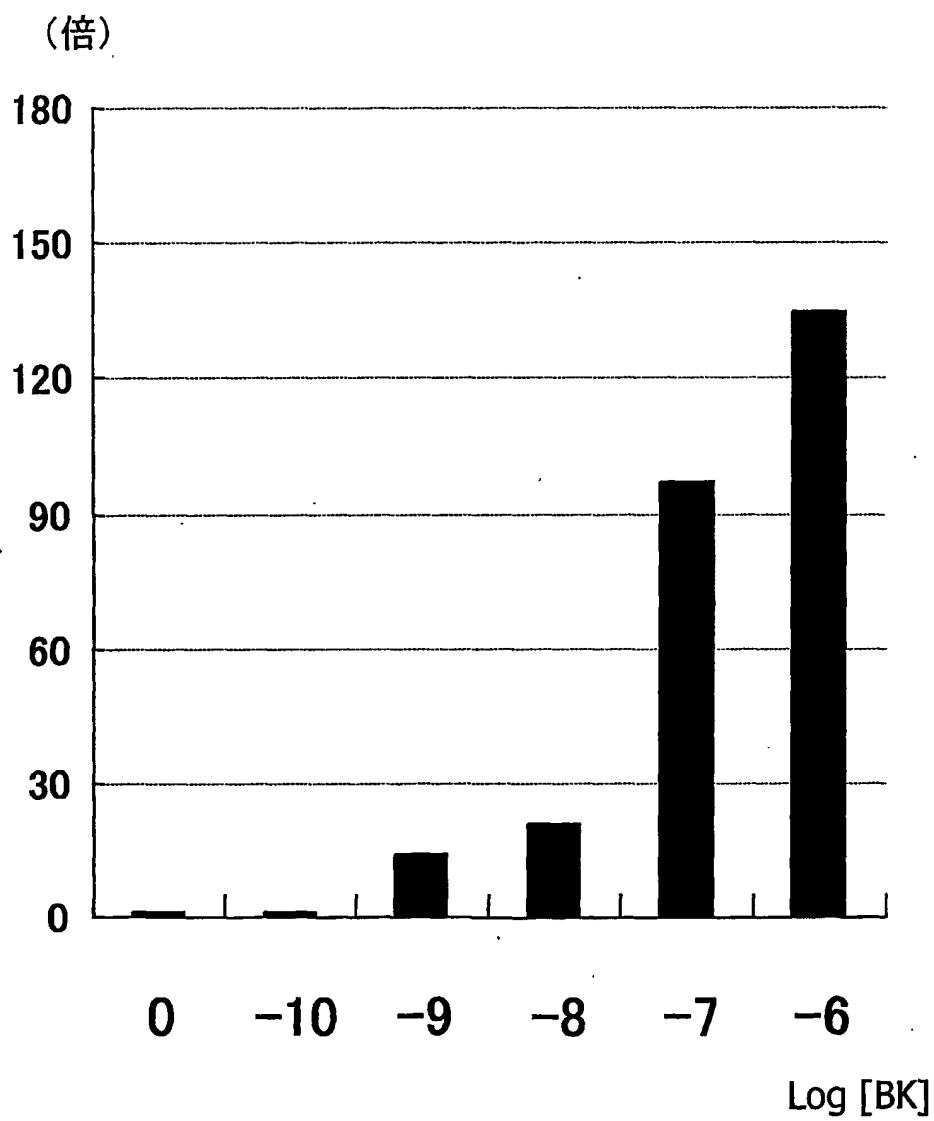
第13図



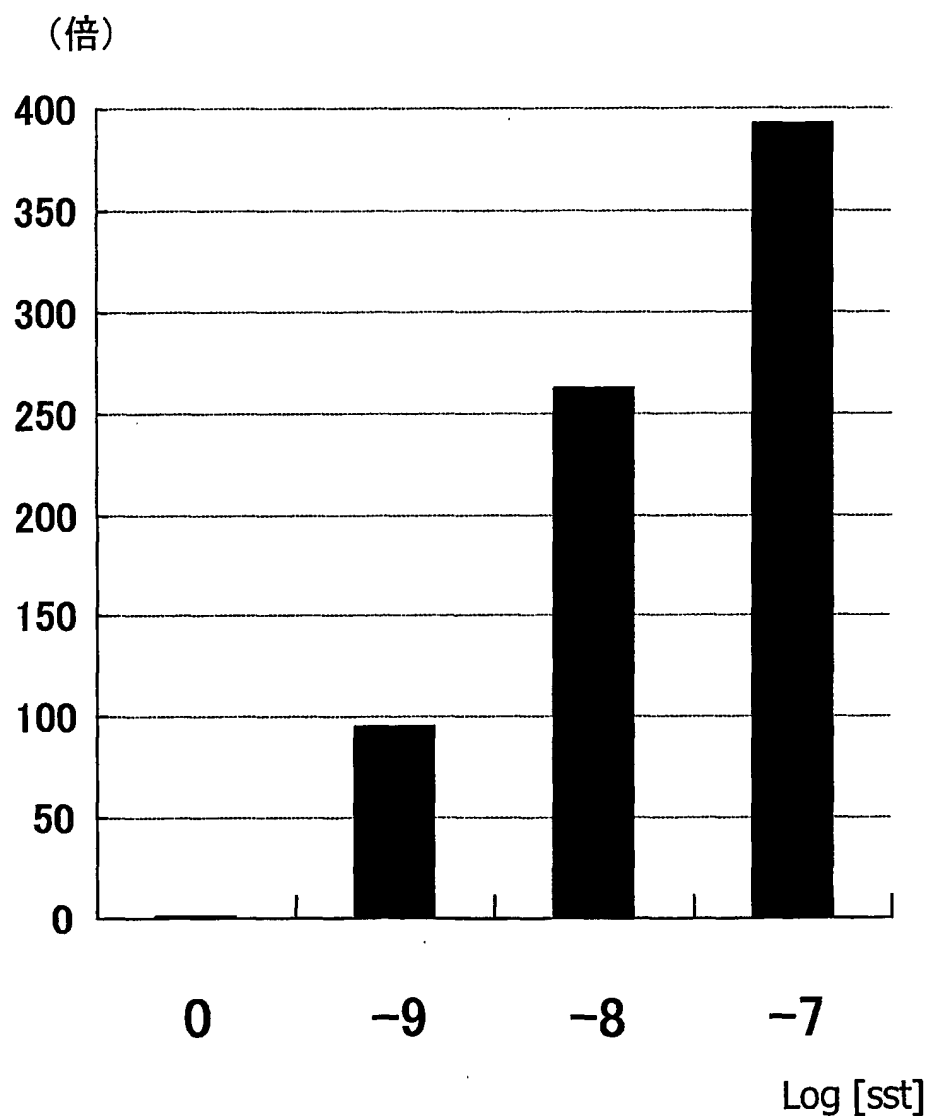
第14図



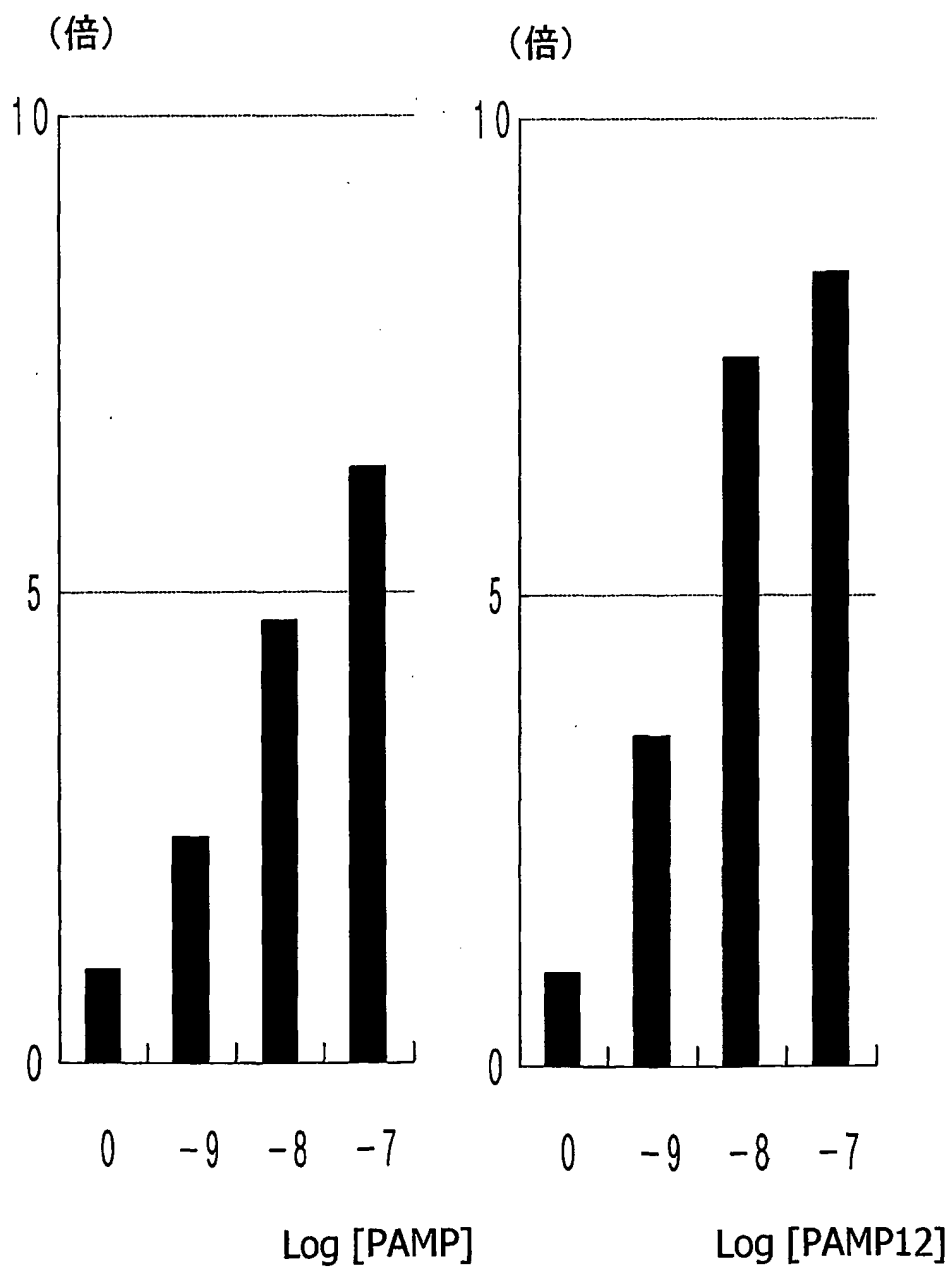
第15図



第16図



第17図



SEQUENCE LISTING

<110> Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.

<120> Endocrine cell lines and use thereof

<130> 1480

<150> JP 2002-113030

<151> 2002-04-16

<160> 198

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Inventor: Sasaki, Katsutoshi; Miura, Kazumi; Saeki, Satoshi;
Inventor: Yoshizawa, Misako; Kishimoto, Kazuya;
Inventor: Kunitomo, Hirofumi; Nishi, Tatsunari; Obinata, Masuo

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 1

atgaagtggc ttagaatccc ttcg

24

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 2
atatactga ttctgcatgc t 21

<210> 3
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 3
gttgattccc agcctcaggc atc 23

<210> 4
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 4
tgaggaacga gctgcagcaa cgg 23

<210> 5
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 5
gatgccccat tttcacagca aag 23

<210> 6
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 6
gttctcccaa acctttgggg cag

23

<210> 7
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 7
ctgagctcca gacacatga acctt

25

<210> 8
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 8
ttaccgttgg cctgaaggag gcg

23

<210> 9
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 9

caggacctca ccacggaaag caa

23

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 10

ggggcgctctg gctcttctcg g

21

<210> 11

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 11

ggtaccctc caagccggac aa

22

<210> 12

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 12

gcaagtttca tttcccatca ccacat

26

<210> 13

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 13

ctgctgtgct gctgctactg ct

22

<210> 14

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 14

caaacctctg gggctgaaac aag

23

<210> 15

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 15

ctccgcctgg ggaacctcaa ca

22

<210> 16
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 16
tttctgttg ctgtgagctt gctg

24

<210> 17
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 17
aaaaggagg aggaggaaa agaca

25

<210> 18
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 18
aggaacagg ataggaata cagg

24

<210> 19
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 19

cccagagcac cagaaagccc ag

22

<210> 20

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 20

ggcgctctt tgacctcttc cc

22

<210> 21

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 21

gaccacaaag aacacaggct ccaa

24

<210> 22

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 22

caggtatcag acttgccaac aggg

24

<210> 23

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 23

catctactct gccgtggatg atgc

24

<210> 24

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 24

gttcctcggg gacagtcaca cag

23

<210> 25

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 25

ccagcatcca tggcatcaag ttcc

24

<210> 26
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 26
gaggaccaag acaaacagca tcttg

25

<210> 27
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 27
tgacggcgat ggtgacgagc gcc

23

<210> 28
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 28
cagcctccca acagcagttg gcc

23

<210> 29
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 29

gggtttgtg actctgggtg tcat

24

<210> 30

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 30

gtgcaagctg cccagataca act

23

<210> 31

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 31

gaaaaggaga aacaacatga tggacaa

27

<210> 32

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 32

agaagaactg caagtctctc tggaa

25

<210> 33

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 33

ggctttgccca tctgttctcc cct

23

<210> 34

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 34

cattttcttc gagtctgttt tctttgt

27

<210> 35

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 35

gaagcagcat gtgcaagatc agtg

24

<210> 36

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 36

caatccttgc atacatgata acaatgag

28

<210> 37

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 37

caatggctac cgggagtgcc

20

<210> 38

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 38

gtacgtgagc acaatggctg

20

<210> 39

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 39

ggatgacaag cagaggaagt atg

23

<210> 40

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 40

gcaggtagca gccttcaca aac

23

<210> 41

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 41

cttccgcgag ctgcgcacca cc

22

<210> 42

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 42

gctggacacc cacaccatga cg

22

<210> 43

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 43

gcctttcatg atccaccage tc

22

<210> 44

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 44

gtgaaccagt agaggtcagt gtc

23

<210> 45

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 45

accgacctgc ctgcaagatc cc

22

<210> 46
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 46
gctcccagtc tgctgcatag aagg

24

<210> 47
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 47
gaccttcagc tccaagagcg agt

23

<210> 48
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 48
gtgaagaagt ggcgctggc cg

22

<210> 49
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 49

aataagcttg tgcacaggat gcctgacacc a

31

<210> 50

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 50

aaatgcggcc gctcagtagg cgtcgggct

29

<210> 51

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 51

gtataagctt gagtccccct aacatgcggc tg

32

<210> 52

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 52

aaatgcggcc gcttgccaa acgcaccgtt ttatttc

37

<210> 53

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 53

tgcccaggct ttgtcaaac agcacctt

28

<210> 54

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 54

ctccagtgcc aaggtctgaa

20

<210> 55

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 55

gtggctggat tgtttgaat gctg

24

<210> 56
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 56
cggttcctct tgggtgtcat caac

24

<210> 57
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 57
ccctcggacc ccagactccg t

21

<210> 58
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 58
ttcttcgacg cagctttgcg ttc

23

<210> 59
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 59

tgaacagagg gctcaatacg aaac

24

<210> 60

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 60

agacagaagg gaggctacaa atcc

24

<210> 61

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 61

taatgatgat ggaaaaactg tggagg

26

<210> 62

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 62

tgctgataga gatggtgtaa atgctg

26

<210> 63

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 63

actctgaggc attctgggac atct

24

<210> 64

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 64

gtcatgttga tggtcaggtc tcctc

25

<210> 65

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 65

gcagactcgc gaagtcact c

21

<210> 66
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 66
gcaggtggct gcatacacgc

20

<210> 67
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 67
gccgggtgga gctggcagtg

20

<210> 68
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 68
cggtcgcagt ggcgcgatgc

20

<210> 69
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 69

gcgataagag ggatgcgacc ctg

23

<210> 70

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 70

ccactgaatc aggatactgc ccac

24

<210> 71

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 71

gagtgcccggt ccattcttgc ttgg

24

<210> 72

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 72

tttcttctct tctccacttg gccc

24

<210> 73

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 73

cccggagcct cggaccacga agtg

24

<210> 74

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 74

aagctgtggt ccgctatgcg cagc

24

<210> 75

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 75

ggacagacga gtgcctcagt tctc

24

<210> 76
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 76
gggcttttgc ctgagcgcag gatc

24

<210> 77
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 77
gaacctatgtc gctgaccaac acaaagacg

29

<210> 78
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 78
cgccctgggt ctcttgtca ttgtc

25

<210> 79
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 79

atcttctggc ctggggtgat gcag

24

<210> 80

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 80

gtctccgagt cctgcttctt cttg

24

<210> 81

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 81

aagggaacaa catcgtagga

20

<210> 82

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 82

cattggcggc ttcatagta

20

<210> 83

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 83

ttagcaactg ggtctgcaat

20

<210> 84

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 84

ggtgtagtcc tacactcatg

20

<210> 85

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 85

ggactcgact gccccaggca g

21

<210> 86
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 86
ccacctgctc acaccgggcc

20

<210> 87
<211> 54
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 87
tcgacaaata aagcaatagc atcacaaatt tcacaaataa agcatttttt tcaa

54

<210> 88
<211> 54
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 88
tgcattgaaa aaaatgcttt atttgtgaaa tttgtgatgc tattgcttta tttg

54

<210> 89
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 89

tgattctag ttgtggttg tccaaactcg agccccggg

39

<210> 90

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 90

gtacccccgg gctcgagttt ggacaaacca caactagaa

39

<210> 91

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 91

tcgacggtat cgattcgact gacgtcatac ttgacgtcac

40

<210> 92

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 92

tcgagtgacg tcaagtatga cgtcagtcga atcgataccg

40

<210> 93

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 93

tataagcttg ccgccgccat gggtgcct

29

<210> 94

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 94

attgttacct ctcttagagc agctcgctact gacg

34

<210> 95

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 95

caccttcgtg agtacaatct ggtctaac

28

<210> 96
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 96
tcgagttaga ccagattgta ctcacgaagg tgcattg

36

<210> 97
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 97
caccttcgtg attgttgtct ctttta

26

<210> 98
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 98
aagcttaaaa gagaccacaa tcacgaaggt gcatg

35

<210> 99
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 99

tatggatcca gccccacat gctcatggcg

30

<210> 100

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 100

aatggtacct cctcagatg aagtgtcctt gg

32

<210> 101

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 101

agccaagctt gcccaggat gggagggc

28

<210> 102

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 102

ctcgaggcgg ccgtcagac tgctgtggac tgcttgatg

39

<210> 103

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 103

gttcatttca aagcttcgc catggcatca tcctctggc cccctctag

49

<210> 104

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 104

ttggttcaat ggtaccttaa ttccgccaga aaagttggaa g

41

<210> 105

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 105

agtcaagctt cctttctcct gcaggtacca tgat

34

<210> 106

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 106

tttatagcgg ccgctcagct agacatcact gggggag

37

<210> 107

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 107

gccccagaag cttaagtgcc caccatggg

29

<210> 108

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 108

gttcattgtg gcggccgcag catcttcagc tgc

33

<210> 109

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 109

agtcaagctt acgcctgcac tccctcccta tg

32

<210> 110

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 110

tttatagcgg ccgcttcaga cctcgctggg agacc

35

<210> 111

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 111

agtcaagctt gttgaagagg acaggggtta aaatg

35

<210> 112

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 112

tttatagcgg ccgcaagggt gctacacatc actgggc

37

<210> 113

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 113

agtcaagctt caggcctcat agccagccat gg

32

<210> 114

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 114

ttatgcggcc gcgctaccag gaggccgagg cag

33

<210> 115

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 115

ctgagcgccg aagcttggcg cgcacatga actcgtggg

39

<210> 116
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 116
ctaaactctt cagcggccgc gcggtccttc actcagac 38

<210> 117
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 117
tactaagctt ggcgagaga catggatgtg act 33

<210> 118
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 118
aatagcggcc gcaaggctgt ctacacggca ctgct 35

<210> 119
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 119

acgtaagctt ccaccatgaa tggcacctac aacacctg

38

<210> 120

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 120

ctcgaggcgg ccgcttaggc gagggtcacg cacagag

37

<210> 121

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 121

gcacatgctt gctgtagcca agcttgcagg tacc

34

<210> 122

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 122

gatccaaaac cgcggccgca ttacatttga ttac

35

<210> 123

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 123

agtcaagctt gttgaagagg acaggggtta aaatg

35

<210> 124

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 124

tttatagcgg ccgcaagggt gctacacatc actgggc

37

<210> 125

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 125

agtcaagctt gccgccacca tggccaactc cacagggtg aa

42

<210> 126
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 126
tgtgacctgt gcaggggtg gat

23

<210> 127
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 127
ggaagcttcc accatgacca actcctctc cacatc

36

<210> 128
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 128
cgctcgagtt accagtgtg gcccgcg

28

<210> 129
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 129

cagtccaagc ttccaccatg ttagccaaca gtcctcaac

40

<210> 130

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 130

gttatagcgg ccgctcagag ggcggaatcc tgggg

35

<210> 131

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 131

gaactaatat aattgcaagc ttaaaaagga aaaaa

35

<210> 132

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 132

cttaaacttc gcggccgctc aaaacatcct tgg

33

<210> 133

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 133

gcccacccca agcttaggtg cactgaccat gag

33

<210> 134

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 134

gggaaaacgc ggccgctgag aggcttataa agcaacgc

37

<210> 135

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 135

agtcaagctt ccaccatgca ggcgcttaac attacccc

38

<210> 136
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 136
gtttatagcg gccgcttaat gccactgtc taaaggagaa

40

<210> 137
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 137
gggaagatga gaagcttctg ccgacggatg ctggc

35

<210> 138
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 138
gaaccacatt ggcgccgca ggacccccaa cctg

34

<210> 139
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 139

gagcccatga gaagcttggc cccttcaggc cc

32

<210> 140

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 140

ctgaaggctg cggccgcacg tggagccacc cgc

33

<210> 141

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 141

agtcaagctt ccaccatggc taaccttgac aaatacactg aaacattc

48

<210> 142

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 142

tttatagcgg ccgcttagcc aatcattgat gaaccactct c

41

<210> 143

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 143

cagtcaagct tccaccatga cgtccacctg caccaac

37

<210> 144

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 144

gttatagcgg ccgcggacag ttcaaggtt gccttagaac

40

<210> 145

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 145

cagtcaagct tccaccatgc aggtcccgaa cagcacccg

38

<210> 146

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 146

gttatagcgg ccgctcagaa cacactctcc tgcctc

36

<210> 147

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 147

gaccgctcga gccaccatga accagacttt gaatagcagt g

41

<210> 148

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 148

ctcgaggtag cacctgtggg cggtctctca g

31

<210> 149

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 149

cggagactct agagggtata taatg

25

<210> 150

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 150

ctaatacgac tcactatagg g

21

<210> 151

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<220>

<221> misc_feature

<222> (8)..(9)

<223> n is a, g, c or t

<400> 151

ggccgcgnns agcctggagc gcat

24

<210> 152

<211> 24

<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(12)
<223> n is a, g c or t

<400> 152
ggccgcggtc nnsctggagc gcat

24

<210> 153
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(12)
<223> n is a, g, c or t

<400> 153
cgcggtcagc nmsgagcgca tggt

24

<210> 154
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<220>

<221> misc_feature

<222> (11)..(12)

<223> n is a, g, c or t

<400> 154

ggtcagcctg nnsccatgg tgtg

24

<210> 155

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<220>

<221> misc_feature

<222> (11)..(12)

<223> n is a, g, c or t

<400> 155

cagcctggag nnsatggtgt gcatc

25

<210> 156

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<220>

<221> misc_feature

<222> (11)..(12)

<223> n is a, g, c or t

<400> 156

cctggagcgc nnsrgtgca tctg

25

<210> 157

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<220>

<221> misc_feature

<222> (11)..(12)

<223> n is a, g, c or t

<400> 157

ggagcgcacg nnstgcacg tgcac

25

<210> 158

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<220>

<221> misc_feature

<222> (11)..(12)

<223> n is a, g, c or t

<400> 158

gcgcatggtg mnsatcgtgc acctg

25

<210> 159

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<220>

<221> misc_feature

<222> (11)..(12)

<223> n is a, g, c or t

<400> 159

catggtgtgc mnsgtgcacc tgcag

25

<210> 160

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<220>

<221> misc_feature

<222> (11)..(12)

<223> n is a, g, c or t

<400> 160

ggtgtgcatc mnsacactgc agcg

24

<210> 161
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(13)
<223> n is a, g, c or t

<400> 161
agtctctgctg snncacgagg atctg

25

<210> 162
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(13)
<223> n is a, g, c or t

<400> 162
ggaagtctctg snnggacacg cggat

25

<210> 163
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<220>

<221> misc_feature

<222> (11)..(12)

<223> n is a, g, c or t

<400> 163

ccggaagtc nnctgggaca cgcg

24

<210> 164

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<220>

<221> misc_feature

<222> (11)..(12)

<223> n is a, g, c or t

<400> 164

gagccggaas nnctgctggg acac

24

<210> 165

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<220>

<221> misc_feature

<222> (12)..(13)

<223> n is a, g, c or t

<400> 165

ggaagagccg snngtcctgc tggga

25

<210> 166

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<220>

<221> misc_feature

<222> (11)..(12)

<223> n is a, g, c or t

<400> 166

gcggaagags nngaagtcct gctgg

25

<210> 167

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<220>

<221> misc_feature

<222> (11)..(12)

<223> n is a, g, c or t

<400> 167

ggtgcggaas nnccggaagt cctg

24

<210> 168

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<220>

<221> misc_feature

<222> (11)..(12)

<223> n is a, g, c or t

<400> 168

gagggtgcgs nngagccgga agtc

24

<210> 169

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<220>

<221> misc_feature

<222> (12)..(13)

<223> n is a, g, c or t

<400> 169

ggaagagggt snngaagagc cgga

25

<210> 170
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(13)
<223> n is a, g, c or t

<400> 170
ggaggaagag snngcggaag agcc

24

<210> 171
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 171
cggagactct agagggtata taatg

25

<210> 172
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 172

ctaatacgac tcactatagg g

21

<210> 173

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 173

ctgetgcate tccgtggcca gataactggc tgtgg

35

<210> 174

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 174

ccacagccag gtatctggcc acggagatgc agcag

35

<210> 175

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 175

ggggtcattg ccategcgcg ctactatgct gtc

33

<210> 176

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 176

gacagcatag taggcgcgcg atggcaatga cccc

34

<210> 177

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 177

cacggccatc gccgtggcgc gctatgtggc cgtg

34

<210> 178

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 178

cacggccaca tagcgcgccca cggcgatggc cgtg

34

<210> 179

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 179

cctgcattgc cgttgcgcg tatttgctg ttgtc

35

<210> 180

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 180

gacaacagcc aaatagcgc caacggcaat gcaagg

36

<210> 181

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 181

acgtaagctt ccaccatgct gccggactgg aagagctc

38

<210> 182

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 182

ctcgaggcgg ccggctactc tgtagtgaag tccgaactt

39

<210> 183

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 183

acgtaagctt ccaccatgga tacaggcccc gaccagtc

38

<210> 184

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 184

ctcgaggcgg ccgctagctt tcagcacagg ccacc

35

<210> 185

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 185

agctaagctt gtcccaaagt tcagtgaaac ccagctgggg

40

<210> 186
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 186
ctttatagtg cggccgctac ctcagctggg tgtaagaggc

40

<210> 187
<211> 365
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> OGR1S221N

<400> 187

Met Gly Asn Ile Thr Ala Asp Asn Ser Ser Met Ser Cys Thr Ile Asp
1 5 10 15

His Thr Ile His Gln Thr Leu Ala Pro Val Val Tyr Val Thr Val Leu
20 25 30

Val Val Gly Phe Pro Ala Asn Cys Leu Ser Leu Tyr Phe Gly Tyr Leu
35 40 45

Gln Ile Lys Ala Arg Asn Glu Leu Gly Val Tyr Leu Cys Asn Leu Thr
50 55 60

Val Ala Asp Leu Phe Tyr Ile Cys Ser Leu Pro Phe Trp Leu Gln Tyr
65 70 75 80

Val Leu Gln His Asp Asn Trp Ser His Gly Asp Leu Ser Cys Gln Val
85 90 95

Cys Gly Ile Leu Leu Tyr Glu Asn Ile Tyr Ile Ser Val Gly Phe Leu
100 105 110

Cys Cys Ile Ser Val Asp Arg Tyr Leu Ala Val Ala His Pro Phe Arg
115 120 125

Phe His Gln Phe Arg Thr Leu Lys Ala Ala Val Gly Val Ser Val Val
130 135 140

Ile Trp Ala Lys Glu Leu Leu Thr Ser Ile Tyr Phe Leu Met His Glu
145 150 155 160

Glu Val Ile Glu Asp Glu Asn Gln His Arg Val Cys Phe Glu His Tyr
165 170 175

Pro Ile Gln Ala Trp Gln Arg Ala Ile Asn Tyr Tyr Arg Phe Leu Val
180 185 190

Gly Phe Leu Phe Pro Ile Cys Leu Leu Leu Ala Ser Tyr Gln Gly Ile
195 200 205

Leu Arg Ala Val Arg Arg Ser His Gly Thr Gln Lys Asn Arg Lys Asp
210 215 220

Gln Ile Gln Arg Leu Val Leu Ser Thr Val Val Ile Phe Leu Ala Cys
225 230 235 240

Phe Leu Pro Tyr His Val Leu Leu Leu Val Arg Ser Val Trp Glu Ala
245 250 255

Ser Cys Asp Phe Ala Lys Gly Val Phe Asn Ala Tyr His Phe Ser Leu
260 265 270

Leu Leu Thr Ser Phe Asn Cys Val Ala Asp Pro Val Leu Tyr Cys Phe
275 280 285

Val Ser Glu Thr Thr His Arg Asp Leu Ala Arg Leu Arg Gly Ala Cys
290 295 300

Leu Ala Phe Leu Thr Cys Ser Arg Thr Gly Arg Ala Arg Glu Ala Tyr
305 310 315 320

Pro Leu Gly Ala Pro Glu Ala Ser Gly Lys Ser Gly Ala Gln Gly Glu
325 330 335

Glu Pro Glu Leu Leu Thr Lys Leu His Pro Ala Phe Gln Thr Pro Asn
340 345 350

Ser Pro Gly Ser Gly Gly Phe Pro Thr Gly Arg Leu Ala
355 360 365

<210> 188

<211> 365

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> OGR1D118A

<400> 188

Met Gly Asn Ile Thr Ala Asp Asn Ser Ser Met Ser Cys Thr Ile Asp
1 5 10 15

His Thr Ile His Gln Thr Leu Ala Pro Val Val Tyr Val Thr Val Leu
20 25 30

Val Val Gly Phe Pro Ala Asn Cys Leu Ser Leu Tyr Phe Gly Tyr Leu
35 40 45

Gln Ile Lys Ala Arg Asn Glu Leu Gly Val Tyr Leu Cys Asn Leu Thr
50 55 60

Val Ala Asp Leu Phe Tyr Ile Cys Ser Leu Pro Phe Trp Leu Gln Tyr
65 70 75 80

Val Leu Gln His Asp Asn Trp Ser His Gly Asp Leu Ser Cys Gln Val
85 90 95

Cys Gly Ile Leu Leu Tyr Glu Asn Ile Tyr Ile Ser Val Gly Phe Leu
100 105 110

Cys Cys Ile Ser Val Ala Arg Tyr Leu Ala Val Ala His Pro Phe Arg
115 120 125

Phe His Gln Phe Arg Thr Leu Lys Ala Ala Val Gly Val Ser Val Val
130 135 140

Ile Trp Ala Lys Glu Leu Leu Thr Ser Ile Tyr Phe Leu Met His Glu
145 150 155 160

Glu Val Ile Glu Asp Glu Asn Gln His Arg Val Cys Phe Glu His Tyr
165 170 175

Pro Ile Gln Ala Trp Gln Arg Ala Ile Asn Tyr Tyr Arg Phe Leu Val
180 185 190

Gly Phe Leu Phe Pro Ile Cys Leu Leu Leu Ala Ser Tyr Gln Gly Ile
195 200 205

Leu Arg Ala Val Arg Arg Ser His Gly Thr Gln Lys Ser Arg Lys Asp
210 215 220

Gln Ile Gln Arg Leu Val Leu Ser Thr Val Val Ile Phe Leu Ala Cys
225 230 235 240

Phe Leu Pro Tyr His Val Leu Leu Leu Val Arg Ser Val Trp Glu Ala
245 250 255

Ser Cys Asp Phe Ala Lys Gly Val Phe Asn Ala Tyr His Phe Ser Leu
260 265 270

Leu Leu Thr Ser Phe Asn Cys Val Ala Asp Pro Val Leu Tyr Cys Phe
275 280 285

Val Ser Glu Thr Thr His Arg Asp Leu Ala Arg Leu Arg Gly Ala Cys
290 295 300

Leu Ala Phe Leu Thr Cys Ser Arg Thr Gly Arg Ala Arg Glu Ala Tyr
305 310 315 320

Pro Leu Gly Ala Pro Glu Ala Ser Gly Lys Ser Gly Ala Gln Gly Glu
325 330 335

Glu Pro Glu Leu Leu Thr Lys Leu His Pro Ala Phe Gln Thr Pro Asn
340 345 350

Ser Pro Gly Ser Gly Gly Phe Pro Thr Gly Arg Leu Ala
355 360 365

<210> 189

<211> 365

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> OGR1S221N/D118A

<400> 189

Met Gly Asn Ile Thr Ala Asp Asn Ser Ser Met Ser Cys Thr Ile Asp
1 5 10 15

His Thr Ile His Gln Thr Leu Ala Pro Val Val Tyr Val Thr Val Leu
20 25 30

Val Val Gly Phe Pro Ala Asn Cys Leu Ser Leu Tyr Phe Gly Tyr Leu
35 40 45

Gln Ile Lys Ala Arg Asn Glu Leu Gly Val Tyr Leu Cys Asn Leu Thr
50 55 60

Val Ala Asp Leu Phe Tyr Ile Cys Ser Leu Pro Phe Trp Leu Gln Tyr
65 70 75 80

Val Leu Gln His Asp Asn Trp Ser His Gly Asp Leu Ser Cys Gln Val
85 90 95

Cys Gly Ile Leu Leu Tyr Glu Asn Ile Tyr Ile Ser Val Gly Phe Leu
100 105 110

Cys Cys Ile Ser Val Ala Arg Tyr Leu Ala Val Ala His Pro Phe Arg
115 120 125

Phe His Gln Phe Arg Thr Leu Lys Ala Ala Val Gly Val Ser Val Val
130 135 140

Ile Trp Ala Lys Glu Leu Leu Thr Ser Ile Tyr Phe Leu Met His Glu
145 150 155 160

Glu Val Ile Glu Asp Glu Asn Gln His Arg Val Cys Phe Glu His Tyr
165 170 175

Pro Ile Gln Ala Trp Gln Arg Ala Ile Asn Tyr Tyr Arg Phe Leu Val
180 185 190

Gly Phe Leu Phe Pro Ile Cys Leu Leu Leu Ala Ser Tyr Gln Gly Ile
195 200 205

Leu Arg Ala Val Arg Arg Ser His Gly Thr Gln Lys Asn Arg Lys Asp
210 215 220

Gln Ile Gln Arg Leu Val Leu Ser Thr Val Val Ile Phe Leu Ala Cys
225 230 235 240

Phe Leu Pro Tyr His Val Leu Leu Leu Val Arg Ser Val Trp Glu Ala
245 250 255

Ser Cys Asp Phe Ala Lys Gly Val Phe Asn Ala Tyr His Phe Ser Leu
260 265 270

Leu Leu Thr Ser Phe Asn Cys Val Ala Asp Pro Val Leu Tyr Cys Phe
275 280 285

Val Ser Glu Thr Thr His Arg Asp Leu Ala Arg Leu Arg Gly Ala Cys
290 295 300

Leu Ala Phe Leu Thr Cys Ser Arg Thr Gly Arg Ala Arg Glu Ala Tyr
305 310 315 320

Pro Leu Gly Ala Pro Glu Ala Ser Gly Lys Ser Gly Ala Gln Gly Glu
325 330 335

Glu Pro Glu Leu Leu Thr Lys Leu His Pro Ala Phe Gln Thr Pro Asn
340 345 350

Ser Pro Gly Ser Gly Gly Phe Pro Thr Gly Arg Leu Ala
355 360 365

<210> 190

<211> 407

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> RE2D124A

<400> 190

Met Ser Leu Asn Ser Ser Leu Ser Cys Arg Lys Glu Leu Ser Asn Leu
1 5 10 15

Thr Glu Glu Glu Gly Gly Glu Gly Gly Val Ile Ile Thr Gln Phe Ile
20 25 30

Ala Ile Ile Val Ile Thr Ile Phe Val Cys Leu Gly Asn Leu Val Ile
35 40 45

Val Val Thr Leu Tyr Lys Lys Ser Tyr Leu Leu Thr Leu Ser Asn Lys
50 55 60

Phe Val Phe Ser Leu Thr Leu Ser Asn Phe Leu Leu Ser Val Leu Val
65 70 75 80

Leu Pro Phe Val Val Thr Ser Ser Ile Arg Arg Glu Trp Ile Phe Gly
85 90 95

Val Val Trp Cys Asn Phe Ser Ala Leu Leu Tyr Leu Leu Ile Ser Ser
100 105 110

Ala Ser Met Leu Thr Leu Gly Val Ile Ala Ile Ala Arg Tyr Tyr Ala
115 120 125

Val Leu Tyr Pro Met Val Tyr Pro Met Lys Ile Thr Gly Asn Arg Ala
130 135 140

Val Met Ala Leu Val Tyr Ile Trp Leu His Ser Leu Ile Gly Cys Leu
145 150 155 160

Pro Pro Leu Phe Gly Trp Ser Ser Val Glu Phe Asp Glu Phe Lys Trp
165 170 175

Met Cys Val Ala Ala Trp His Arg Glu Pro Gly Tyr Thr Ala Phe Trp
180 185 190

Gln Ile Trp Cys Ala Leu Phe Pro Phe Leu Val Met Leu Val Cys Tyr
195 200 205

Gly Phe Ile Phe Arg Val Ala Arg Val Lys Ala Arg Lys Val His Cys
210 215 220

Gly Thr Val Val Ile Val Glu Glu Asp Ala Gln Arg Thr Gly Arg Lys
225 230 235 240

Asn Ser Ser Thr Ser Thr Ser Ser Ser Gly Ser Arg Arg Asn Ala Phe
245 250 255

Gln Gly Val Val Tyr Ser Ala Asn Gln Cys Lys Ala Leu Ile Thr Ile
260 265 270

Leu Val Val Leu Gly Ala Phe Met Val Thr Trp Gly Pro Tyr Met Val
275 280 285

Val Ile Ala Ser Glu Ala Leu Trp Gly Lys Ser Ser Val Ser Pro Ser
290 295 300

Leu Glu Thr Trp Ala Thr Trp Leu Ser Phe Ala Ser Ala Val Cys His
305 310 315 320

Pro Leu Ile Tyr Gly Leu Trp Asn Lys Thr Val Arg Lys Glu Leu Leu
325 330 335

Gly Met Cys Phe Gly Asp Arg Tyr Tyr Arg Glu Pro Phe Val Gln Arg
340 345 350

Gln Arg Thr Ser Arg Leu Phe Ser Ile Ser Asn Arg Ile Thr Asp Leu
355 360 365

Gly Leu Ser Pro His Leu Thr Ala Leu Met Ala Gly Gly Gln Pro Leu
370 375 380

Gly His Ser Ser Ser Thr Gly Asp Thr Gly Phe Ser Cys Ser Gln Asp
385 390 395 400

Ser Gly Asn Leu Arg Ala Leu
405

<210> 191
<211> 309
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> GPR35D113A

<400> 191

Met Asn Gly Thr Tyr Asn Thr Cys Gly Ser Ser Asp Leu Thr Trp Pro
1 5 10 15

Pro Ala Ile Lys Leu Gly Phe Tyr Ala Tyr Leu Gly Val Leu Leu Val
20 25 30

Leu Gly Leu Leu Leu Asn Ser Leu Ala Leu Trp Val Phe Cys Cys Arg
35 40 45

Met Gln Gln Trp Thr Glu Thr Arg Ile Tyr Met Thr Asn Leu Ala Val
50 55 60

Ala Asp Leu Cys Leu Leu Cys Thr Leu Pro Phe Val Leu His Ser Leu
65 70 75 80

Arg Asp Thr Ser Asp Thr Pro Leu Cys Gln Leu Ser Gln Gly Ile Tyr
85 90 95

Leu Thr Asn Arg Tyr Met Ser Ile Ser Leu Val Thr Ala Ile Ala Val
100 105 110

Ala Arg Tyr Val Ala Val Arg His Pro Leu Arg Ala Arg Gly Leu Arg
115 120 125

Ser Pro Arg Gln Ala Ala Ala Val Cys Ala Val Leu Trp Val Leu Val
130 135 140

Ile Gly Ser Leu Val Ala Arg Trp Leu Leu Gly Ile Gln Glu Gly Gly
145 150 155 160

Phe Cys Phe Arg Ser Thr Arg His Asn Phe Asn Ser Met Arg Phe Pro
165 170 175

Leu Leu Gly Phe Tyr Leu Pro Leu Ala Val Val Val Phe Cys Ser Leu
180 185 190

Lys Val Val Thr Ala Leu Ala Gln Arg Pro Pro Thr Asp Val Gly Gln
195 200 205

Ala Glu Ala Thr Arg Lys Ala Ala Arg Met Val Trp Ala Asn Leu Leu
210 215 220

Val Phe Val Val Cys Phe Leu Pro Leu His Val Gly Leu Thr Val Arg
225 230 235 240

Leu Ala Val Gly Trp Asn Ala Cys Ala Leu Leu Glu Thr Ile Arg Arg
245 250 255

Ala Leu Tyr Ile Thr Ser Lys Leu Ser Asp Ala Asn Cys Cys Leu Asp
260 265 270

Ala Ile Cys Tyr Tyr Tyr Met Ala Lys Glu Phe Gln Glu Ala Ser Ala
275 280 285

Leu Ala Val Ala Pro Arg Ala Lys Ala His Lys Ser Gln Asp Ser Leu
290 295 300

Cys Val Thr Leu Ala
305

<210> 192
<211> 337
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> GPCR25D111A

<400> 192

Met Asn Ser Thr Cys Ile Glu Glu Gln His Asp Leu Asp His Tyr Leu
1 5 10 15

Phe Pro Ile Val Tyr Ile Phe Val Ile Ile Val Ser Ile Pro Ala Asn
20 25 30

Ile Gly Ser Leu Cys Val Ser Phe Leu Gln Pro Lys Lys Glu Ser Glu
35 40 45

Leu Gly Ile Tyr Leu Phe Ser Leu Ser Leu Ser Asp Leu Leu Tyr Ala
50 55 60

Leu Thr Leu Pro Leu Trp Ile Asp Tyr Thr Trp Asn Lys Asp Asn Trp
65 70 75 80

Thr Phe Ser Pro Ala Leu Cys Lys Gly Ser Ala Phe Leu Met Tyr Met
85 90 95

Lys Phe Tyr Ser Ser Thr Ala Phe Leu Thr Cys Ile Ala Val Ala Arg
100 105 110

Tyr Leu Ala Val Val Tyr Pro Leu Lys Phe Phe Phe Leu Arg Thr Arg
115 120 125

Arg Ile Ala Leu Met Val Ser Leu Ser Ile Trp Ile Leu Glu Thr Ile
130 135 140

Phe Asn Ala Val Met Leu Trp Glu Asp Glu Thr Val Val Glu Tyr Cys
145 150 155 160

Asp Ala Glu Lys Ser Asn Phe Thr Leu Cys Tyr Asp Lys Tyr Pro Leu
165 170 175

Glu Lys Trp Gln Ile Asn Leu Asn Leu Phe Arg Thr Cys Thr Gly Tyr
180 185 190

Ala Ile Pro Leu Val Thr Ile Leu Ile Cys Asn Arg Lys Val Tyr Gln
195 200 205

Ala Val Arg His Asn Lys Ala Thr Glu Asn Lys Glu Lys Lys Arg Ile
210 215 220

Ile Lys Leu Leu Val Ser Ile Thr Val Thr Phe Val Leu Cys Phe Thr
225 230 235 240

Pro Phe His Val Met Leu Leu Ile Arg Cys Ile Leu Glu His Ala Val
245 250 255

Asn Phe Glu Asp His Ser Asn Ser Gly Lys Arg Thr Tyr Thr Met Tyr
260 265 270

Arg Ile Thr Val Ala Leu Thr Ser Leu Asn Cys Val Ala Asp Pro Ile
275 280 285

Leu Tyr Cys Phe Val Thr Glu Thr Gly Arg Tyr Asp Met Trp Asn Ile
290 295 300

Leu Lys Phe Cys Thr Gly Arg Cys Asn Thr Ser Gln Arg Gln Arg Lys
305 310 315 320

Arg Ile Leu Ser Val Ser Thr Lys Asp Thr Met Glu Leu Glu Val Leu
325 330 335

Glu

<210> 193

<211> 361

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> PGM0334E135F

<400> 193

Met Ser Pro Glu Cys Ala Arg Ala Ala Gly Asp Ala Pro Leu Arg Ser
1 5 10 15

Leu Glu Gln Ala Asn Arg Thr Arg Phe Pro Phe Phe Ser Asp Val Lys
20 25 30

Gly Asp His Arg Leu Val Leu Ala Ala Val Glu Thr Thr Val Leu Val
35 40 45

Leu Ile Phe Ala Val Ser Leu Leu Gly Asn Val Cys Ala Leu Val Leu
50 55 60

Val Ala Arg Arg Arg Arg Arg Gly Ala Thr Ala Cys Leu Val Leu Asn
65 70 75 80

Leu Phe Cys Ala Asp Leu Leu Phe Ile Ser Ala Ile Pro Leu Val Leu
85 90 95

Ala Val Arg Trp Thr Glu Ala Trp Leu Leu Gly Pro Val Ala Cys His
100 105 110

Leu Leu Phe Tyr Val Met Thr Leu Ser Gly Ser Val Thr Ile Leu Thr
115 120 125

Leu Ala Ala Val Ser Leu Phe Arg Met Val Cys Ile Val His Leu Gln
130 135 140

Arg Gly Val Arg Gly Pro Gly Arg Arg Ala Arg Ala Val Leu Leu Ala
145 150 155 160

Leu Ile Trp Gly Tyr Ser Ala Val Ala Ala Leu Pro Leu Cys Val Phe
165 170 175

Phe Arg Val Val Pro Gln Arg Leu Pro Gly Ala Asp Gln Glu Ile Ser
180 185 190

Ile Cys Thr Leu Ile Trp Pro Thr Ile Pro Gly Glu Ile Ser Trp Asp
195 200 205

Val Ser Phe Val Thr Leu Asn Phe Leu Val Pro Gly Leu Val Ile Val
210 215 220

Ile Ser Tyr Ser Lys Ile Leu Gln Ile Thr Lys Ala Ser Arg Lys Arg
225 230 235 240

Leu Thr Val Ser Leu Ala Tyr Ser Glu Ser His Gln Ile Arg Val Ser
245 250 255

Gln Gln Asp Phe Arg Leu Phe Arg Thr Leu Phe Leu Leu Met Val Ser
260 265 270

Phe Phe Ile Met Trp Ser Pro Ile Ile Ile Thr Ile Leu Leu Ile Leu
275 280 285

Ile Gln Asn Phe Lys Gln Asp Leu Val Ile Trp Pro Ser Leu Phe Phe
290 295 300

Trp Val Val Ala Phe Thr Phe Ala Asn Ser Ala Leu Asn Pro Ile Leu
305 310 315 320

Tyr Asn Met Thr Leu Cys Arg Asn Glu Trp Lys Lys Ile Phe Cys Cys
325 330 335

Phe Trp Phe Pro Glu Lys Gly Ala Ile Leu Thr Asp Thr Ser Val Lys
340 345 350

Arg Asn Asp Leu Ser Ile Ile Ser Gly
355 360

<210> 194
<211> 361
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> PGM0334E135Q

<400> 194

Met Ser Pro Glu Cys Ala Arg Ala Ala Gly Asp Ala Pro Leu Arg Ser
1 5 10 15

Leu Glu Gln Ala Asn Arg Thr Arg Phe Pro Phe Phe Ser Asp Val Lys
20 25 30

Gly Asp His Arg Leu Val Leu Ala Ala Val Glu Thr Thr Val Leu Val
35 40 45

Leu Ile Phe Ala Val Ser Leu Leu Gly Asn Val Cys Ala Leu Val Leu
50 55 60

Val Ala Arg Arg Arg Arg Arg Gly Ala Thr Ala Cys Leu Val Leu Asn
65 70 75 80

Leu Phe Cys Ala Asp Leu Leu Phe Ile Ser Ala Ile Pro Leu Val Leu
85 90 95

Ala Val Arg Trp Thr Glu Ala Trp Leu Leu Gly Pro Val Ala Cys His
100 105 110

Leu Leu Phe Tyr Val Met Thr Leu Ser Gly Ser Val Thr Ile Leu Thr
115 120 125

Leu Ala Ala Val Ser Leu Gln Arg Met Val Cys Ile Val His Leu Gln
130 135 140

Arg Gly Val Arg Gly Pro Gly Arg Arg Ala Arg Ala Val Leu Leu Ala
145 150 155 160

Leu Ile Trp Gly Tyr Ser Ala Val Ala Ala Leu Pro Leu Cys Val Phe
165 170 175

Phe Arg Val Val Pro Gln Arg Leu Pro Gly Ala Asp Gln Glu Ile Ser
180 185 190

Ile Cys Thr Leu Ile Trp Pro Thr Ile Pro Gly Glu Ile Ser Trp Asp
195 200 205

Val Ser Phe Val Thr Leu Asn Phe Leu Val Pro Gly Leu Val Ile Val
210 215 220

Ile Ser Tyr Ser Lys Ile Leu Gln Ile Thr Lys Ala Ser Arg Lys Arg
225 230 235 240

Leu Thr Val Ser Leu Ala Tyr Ser Glu Ser His Gln Ile Arg Val Ser
245 250 255

Gln Gln Asp Phe Arg Leu Phe Arg Thr Leu Phe Leu Leu Met Val Ser
260 265 270

Phe Phe Ile Met Trp Ser Pro Ile Ile Ile Thr Ile Leu Leu Ile Leu
275 280 285

Ile Gln Asn Phe Lys Gln Asp Leu Val Ile Trp Pro Ser Leu Phe Phe
290 295 300

Trp Val Val Ala Phe Thr Phe Ala Asn Ser Ala Leu Asn Pro Ile Leu
305 310 315 320

Tyr Asn Met Thr Leu Cys Arg Asn Glu Trp Lys Lys Ile Phe Cys Cys
325 330 335

Phe Trp Phe Pro Glu Lys Gly Ala Ile Leu Thr Asp Thr Ser Val Lys
340 345 350

Arg Asn Asp Leu Ser Ile Ile Ser Gly
355 360

<210> 195

<211> 361

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> PGM0334E135A

<400> 195

Met Ser Pro Glu Cys Ala Arg Ala Ala Gly Asp Ala Pro Leu Arg Ser
1 5 10 15

Leu Glu Gln Ala Asn Arg Thr Arg Phe Pro Phe Phe Ser Asp Val Lys
20 25 30

Gly Asp His Arg Leu Val Leu Ala Ala Val Glu Thr Thr Val Leu Val
35 40 45

Leu Ile Phe Ala Val Ser Leu Leu Gly Asn Val Cys Ala Leu Val Leu
50 55 60

Val Ala Arg Arg Arg Arg Arg Gly Ala Thr Ala Cys Leu Val Leu Asn
65 70 75 80

Leu Phe Cys Ala Asp Leu Leu Phe Ile Ser Ala Ile Pro Leu Val Leu
85 90 95

Ala Val Arg Trp Thr Glu Ala Trp Leu Leu Gly Pro Val Ala Cys His
100 105 110

Leu Leu Phe Tyr Val Met Thr Leu Ser Gly Ser Val Thr Ile Leu Thr
115 120 125

Leu Ala Ala Val Ser Leu Ala Arg Met Val Cys Ile Val His Leu Gln
130 135 140

Arg Gly Val Arg Gly Pro Gly Arg Arg Ala Arg Ala Val Leu Leu Ala
145 150 155 160

Leu Ile Trp Gly Tyr Ser Ala Val Ala Ala Leu Pro Leu Cys Val Phe
165 170 175

Phe Arg Val Val Pro Gln Arg Leu Pro Gly Ala Asp Gln Glu Ile Ser
180 185 190

Ile Cys Thr Leu Ile Trp Pro Thr Ile Pro Gly Glu Ile Ser Trp Asp
195 200 205

Val Ser Phe Val Thr Leu Asn Phe Leu Val Pro Gly Leu Val Ile Val
210 215 220

Ile Ser Tyr Ser Lys Ile Leu Gln Ile Thr Lys Ala Ser Arg Lys Arg
225 230 235 240

Leu Thr Val Ser Leu Ala Tyr Ser Glu Ser His Gln Ile Arg Val Ser
245 250 255

Gln Gln Asp Phe Arg Leu Phe Arg Thr Leu Phe Leu Leu Met Val Ser
260 265 270

Phe Phe Ile Met Trp Ser Pro Ile Ile Ile Thr Ile Leu Leu Ile Leu
275 280 285

Ile Gln Asn Phe Lys Gln Asp Leu Val Ile Trp Pro Ser Leu Phe Phe
290 295 300

Trp Val Val Ala Phe Thr Phe Ala Asn Ser Ala Leu Asn Pro Ile Leu
305 310 315 320

Tyr Asn Met Thr Leu Cys Arg Asn Glu Trp Lys Lys Ile Phe Cys Cys
325 330 335

Phe Trp Phe Pro Glu Lys Gly Ala Ile Leu Thr Asp Thr Ser Val Lys
340 345 350

Arg Asn Asp Leu Ser Ile Ile Ser Gly
355 360

<210> 196
<211> 361
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> PGM0334D259S

<400> 196

Met Ser Pro Glu Cys Ala Arg Ala Ala Gly Asp Ala Pro Leu Arg Ser
1 5 10 15

Leu Glu Gln Ala Asn Arg Thr Arg Phe Pro Phe Phe Ser Asp Val Lys
20 25 30

Gly Asp His Arg Leu Val Leu Ala Ala Val Glu Thr Thr Val Leu Val
35 40 45

Leu Ile Phe Ala Val Ser Leu Leu Gly Asn Val Cys Ala Leu Val Leu
50 55 60

Val Ala Arg Arg Arg Arg Arg Gly Ala Thr Ala Cys Leu Val Leu Asn
65 70 75 80

Leu Phe Cys Ala Asp Leu Leu Phe Ile Ser Ala Ile Pro Leu Val Leu
85 90 95

Ala Val Arg Trp Thr Glu Ala Trp Leu Leu Gly Pro Val Ala Cys His
100 105 110

Leu Leu Phe Tyr Val Met Thr Leu Ser Gly Ser Val Thr Ile Leu Thr
115 120 125

Leu Ala Ala Val Ser Leu Glu Arg Met Val Cys Ile Val His Leu Gln
130 135 140

Arg Gly Val Arg Gly Pro Gly Arg Arg Ala Arg Ala Val Leu Leu Ala
145 150 155 160

Leu Ile Trp Gly Tyr Ser Ala Val Ala Ala Leu Pro Leu Cys Val Phe
165 170 175

Phe Arg Val Val Pro Gln Arg Leu Pro Gly Ala Asp Gln Glu Ile Ser
180 185 190

Ile Cys Thr Leu Ile Trp Pro Thr Ile Pro Gly Glu Ile Ser Trp Asp
195 200 205

Val Ser Phe Val Thr Leu Asn Phe Leu Val Pro Gly Leu Val Ile Val
210 215 220

Ile Ser Tyr Ser Lys Ile Leu Gln Ile Thr Lys Ala Ser Arg Lys Arg
225 230 235 240

Leu Thr Val Ser Leu Ala Tyr Ser Glu Ser His Gln Ile Arg Val Ser
245 250 255

Gln Gln Ser Phe Arg Leu Phe Arg Thr Leu Phe Leu Leu Met Val Ser
 260 265 270

Phe Phe Ile Met Trp Ser Pro Ile Ile Ile Thr Ile Leu Leu Ile Leu
 275 280 285

Ile Gln Asn Phe Lys Gln Asp Leu Val Ile Trp Pro Ser Leu Phe Phe
 290 295 300

Trp Val Val Ala Phe Thr Phe Ala Asn Ser Ala Leu Asn Pro Ile Leu
 305 310 315 320

Tyr Asn Met Thr Leu Cys Arg Asn Glu Trp Lys Lys Ile Phe Cys Cys
 325 330 335

Phe Trp Phe Pro Glu Lys Gly Ala Ile Leu Thr Asp Thr Ser Val Lys
 340 345 350

Arg Asn Asp Leu Ser Ile Ile Ser Gly
 355 360

<210> 197
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> GPR43R217P

<400> 197

Met Leu Pro Asp Trp Lys Ser Ser Leu Ile Leu Met Ala Tyr Ile Ile
 1 5 10 15

Ile Phe Leu Thr Gly Leu Pro Ala Asn Leu Leu Ala Leu Arg Ala Phe
20 25 30

Val Gly Arg Ile Arg Gln Pro Gln Pro Ala Pro Val His Ile Leu Leu
35 40 45

Leu Ser Leu Thr Leu Ala Asp Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro Phe
50 55 60

Lys Ile Ile Glu Ala Ala Ser Asn Phe Arg Trp Tyr Leu Pro Lys Val
65 70 75 80

Val Cys Ala Leu Thr Ser Phe Gly Phe Tyr Ser Ser Ile Tyr Cys Ser
85 90 95

Thr Trp Leu Leu Ala Gly Ile Ser Ile Glu Arg Tyr Leu Gly Val Ala
100 105 110

Phe Pro Val Gln Tyr Lys Leu Ser Arg Arg Pro Leu Tyr Gly Val Ile
115 120 125

Ala Ala Leu Val Ala Trp Val Met Ser Phe Gly His Cys Thr Ile Val
130 135 140

Ile Ile Val Gln Tyr Leu Asn Thr Thr Glu Gln Val Arg Ser Gly Asn
145 150 155 160

Glu Ile Thr Cys Tyr Glu Asn Phe Thr Asp Asn Gln Leu Asp Val Val
165 170 175

Leu Pro Val Arg Leu Glu Leu Cys Leu Val Leu Phe Phe Ile Pro Met
180 185 190

Ala Val Thr Ile Phe Cys Tyr Trp Arg Phe Val Trp Ile Met Leu Ser
195 200 205

Gln Pro Leu Val Gly Ala Gln Arg Pro Arg Arg Ala Val Gly Leu Ala
210 215 220

Val Val Thr Leu Leu Asn Phe Leu Val Cys Phe Gly Pro Tyr Asn Val
225 230 235 240

Ser His Leu Val Gly Tyr His Gln Arg Lys Ser Pro Trp Trp Arg Ser
245 250 255

Ile Ala Val Val Phe Ser Ser Leu Asn Ala Ser Leu Asp Pro Leu Leu
260 265 270

Phe Tyr Phe Ser Ser Ser Val Val Arg Arg Ala Phe Gly Arg Gly Leu
275 280 285

Gln Val Leu Arg Asn Gln Gly Ser Ser Leu Leu Gly Arg Arg Gly Lys
290 295 300

Asp Thr Ala Glu Gly Thr Asn Glu Asp Arg Gly Val Gly Gln Gly Glu
305 310 315 320

Gly Met Pro Ser Ser Asp Phe Thr Thr Glu
325 330

<210> 198
<211> 330
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> GPR43R217P/E106D

<400> 198

Met Leu Pro Asp Trp Lys Ser Ser Leu Ile Leu Met Ala Tyr Ile Ile
1 5 10 15

Ile Phe Leu Thr Gly Leu Pro Ala Asn Leu Leu Ala Leu Arg Ala Phe
20 25 30

Val Gly Arg Ile Arg Gln Pro Gln Pro Ala Pro Val His Ile Leu Leu
35 40 45

Leu Ser Leu Thr Leu Ala Asp Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro Phe
50 55 60

Lys Ile Ile Glu Ala Ala Ser Asn Phe Arg Trp Tyr Leu Pro Lys Val
65 70 75 80

Val Cys Ala Leu Thr Ser Phe Gly Phe Tyr Ser Ser Ile Tyr Cys Ser
85 90 95

Thr Trp Leu Leu Ala Gly Ile Ser Ile Asp Arg Tyr Leu Gly Val Ala
100 105 110

Phe Pro Val Gln Tyr Lys Leu Ser Arg Arg Pro Leu Tyr Gly Val Ile
115 120 125

Ala Ala Leu Val Ala Trp Val Met Ser Phe Gly His Cys Thr Ile Val
130 135 140

Ile Ile Val Gln Tyr Leu Asn Thr Thr Glu Gln Val Arg Ser Gly Asn
145 150 155 160

Glu Ile Thr Cys Tyr Glu Asn Phe Thr Asp Asn Gln Leu Asp Val Val
165 170 175

Leu Pro Val Arg Leu Glu Leu Cys Leu Val Leu Phe Phe Ile Pro Met
180 185 190

Ala Val Thr Ile Phe Cys Tyr Trp Arg Phe Val Trp Ile Met Leu Ser
195 200 205

Gln Pro Leu Val Gly Ala Gln Arg Pro Arg Arg Ala Val Gly Leu Ala
210 215 220

Val Val Thr Leu Leu Asn Phe Leu Val Cys Phe Gly Pro Tyr Asn Val
225 230 235 240

Ser His Leu Val Gly Tyr His Gln Arg Lys Ser Pro Trp Trp Arg Ser
245 250 255

Ile Ala Val Val Phe Ser Ser Leu Asn Ala Ser Leu Asp Pro Leu Leu
260 265 270

Phe Tyr Phe Ser Ser Ser Val Val Arg Arg Ala Phe Gly Arg Gly Leu
275 280 285

Gln Val Leu Arg Asn Gln Gly Ser Ser Leu Leu Gly Arg Arg Gly Lys
290 295 300

Asp Thr Ala Glu Gly Thr Asn Glu Asp Arg Gly Val Gly Gln Gly Glu
305 310 315 320

Gly Met Pro Ser Ser Asp Phe Thr Thr Glu
325 330